

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**

**Departamento de Química Analítica**



**POLIMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR PARA LA  
DETERMINACIÓN DE INSECTICIDAS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Carmen del Cacho Vicente**

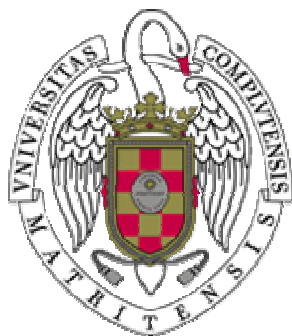
Bajo la dirección de los doctores

Concepción Pérez-Conde  
Esther Turiel Trujillo

**Madrid, 2009**

- **ISBN: 978-84-692-8406-3**

Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Ciencias Químicas  
Departamento de Química Analítica



# POLIMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS

Directores:  
Concepción Pérez-Conde  
Esther Turiel Trujillo

CARMEN DEL CACHO VICENTE  
Madrid, 2009



## *Agradecimientos*

Hace muchos años soñaba con aprender..., y al final ese sueño se ha hecho realidad. Quisiera agradecer a todas aquellas personas que me han ayudado a lo largo de este camino.

En primer lugar a mis directoras, Conchita y Esther, por haberme ofrecido siempre todo su apoyo, tanto a nivel profesional como personal. No quiero olvidar a Antonio, ese jefe que, con sus enseñanzas y buenos consejos, nos ha ayudado en todo momento.

Con especial cariño a Carmen, por haber confiado en mí desde el primer momento y por su inestimable ayuda en todos los aspectos.

Al departamento de Química Analítica de la Universidad Complutense de Madrid, por brindarme todos los medios necesarios.

A todos mis compañeros y amigos a lo largo de estos años, Marta, Rosa, Patricia, Ana, Isabel, Rocío, Mer, Rian, Diego, Adriana, Estrella, Christian, Pili, Zoeyne, Boryana, Jon, Ana Belén, Susana, Mabel, Estefanía, Marilyn... No puedo olvidarme de mis compañeros de fatigas, de mis “niños”, sin los cuales este viaje nunca habría llegado a buen puerto: Elena, Raquel, Esteban, Laura, Olivia...

To the PAR&D group at AstraZeneca Mölnådal, for the wonderful time we spent together: Lars, Jonas, Ingela, Lisa, Annas... Even being an Xpat, you made me feel as if I were at home at all moment. I'm most grateful towards Leif, who introduced me in the “secret garden” of capillary electrochromatography and multivariate analysis. Tack så mycket för allt!

Por último, mi más sincero agradecimiento a mi familia, especialmente a mis padres, Augusto y Carmen, por su cariño y comprensión, así como por su ayuda incondicional en todo momento.

***¡¡¡GRACIAS A TODOS!!!***



*A todos los que han contribuido  
a enriquecer mi “pequeño” tesoro*





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

Ciudad Universitaria  
28040 Madrid (España)  
Tlfo, 91-39444219  
Fax 91- 3944329

**Dra. M<sup>a</sup> Concepción Pérez Conde.** Profesora Titular del departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid.

**Dra. Esther Turiel Trujillo.** Investigador Titular del departamento de Química Ambiental del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

**HACEN CONSTAR:** que el presente trabajo titulado “Polímeros de impresión molecular para la determinación de pesticidas” ha sido realizado por la Lcda. *Carmen del Cacho Vicente* en este departamento bajo nuestra dirección constituyendo la Tesis Doctoral de su autor.

Madrid, 15 de Noviembre de 2008

Fdo: Dra. Concepción Pérez Conde

Fdo: Dra. Esther Turiel Trujillo





# ÍNDICE

<b>I. SUMMARY</b>	<b>1</b>
<b>II. OBJECTIVES</b>	<b>7</b>
<b>III. INTRODUCCION</b>	<b>11</b>
<b>1. Polímeros de impresión molecular (MIPs)</b>	<b>13</b>
1.1. Conceptos generales	15
1.2. Síntesis	17
1.3. Caracterización	47
1.4. Aplicaciones	52
1.5. Bibliografía	61
<b>2. Plaguicidas</b>	<b>73</b>
2.1. Conceptos generales	75
2.2. Herbicidas	87
2.3. Fungicidas	97
2.4. Bibliografía	104
<b>3. Revisión de métodos</b>	<b>107</b>
3.1. Métodos empleados para la determinación de triazinas	109
3.2. Métodos empleados para la determinación de benzimidazoles	123
3.3. Bibliografía	138
<b>IV. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>147</b>
<b>1. Empleo de polímeros impresos no covalentes para la determinación de triazinas en vegetales</b>	<b>149</b>
<b>2. Caracterización físico-química de polímeros impresos mediante la isoterma de Langmuir-Freundlich</b>	<b>163</b>
<b>3. Empleo de polímeros impresos semi-covalentes para la determinación de triazinas en muestras complejas y su caracterización físico-química</b>	<b>177</b>
<b>4. Empleo de polímeros impresos para la determinación de benzimidazoles en muestras de agua</b>	<b>193</b>
<b>5. Empleo de polímeros impresos como fases estacionarias en electrocromatografía capilar</b>	<b>231</b>
5.1. Separación del racémico de propranolol	233
5.2. Determinación de tiabendazol en cítricos	241
<b>V. DISCUSION INTEGRADORA</b>	<b>253</b>
<b>1. Polímeros impresos con propazina</b>	<b>255</b>
<b>2. Polímeros impresos con tiabendazol</b>	<b>266</b>
<b>VI. CONCLUDING REMARKS</b>	<b>281</b>



# *I. SUMMARY*



## I. SUMMARY

*Different analytical methodologies based on molecularly imprinting technology have been developed in order to quantify the amount of triazines and benzimidazole compounds present in complex samples.*

*In this sense, two propazine imprinted polymers (MIPs) have been synthesized by precipitation polymerization by either the non-covalent or the semi-covalent imprinting approaches. These imprinted polymers were synthesized using propazine as template molecule, methacrylic acid as functional monomer, ethyleneglycol dimethacrylate as cross-linker, azo-bis-isobutyronitrile as azo-initiator and toluene as porogen. In the case of the semi-covalent imprinted polymer, however, an initial synthetic step had to be carried out prior to polymerization in order to prepare propazine methacrylate. It has been demonstrated that both MIPs are able of selectively rebinding both propazine and other triazinic herbicides such as atrazine, simazine, deethylatrazine, and deisopropylatrazine.*

*Propazine-MIPs have been successfully applied to the determination of triazine herbicides (atrazine, simazine, propazine, deethylatrazine, deisopropylatrazine) in soil and vegetable (pea, corn and potato) samples. In order to completely remove non-specific bound interferents, however, an initial clean-up step of the most complex sample extracts (corn and potatoes) had to be performed prior to MISPE on the non-covalent imprinted polymer. A direct sample clean-up treatment of all the samples could be carried out by the semi-covalent imprinted polymer. Any of the developed methodologies were able of quantitatively recover triazines from*

*spiked samples at concentration levels below the legislated maximum residue limits (MRLs).*

*Two thiabendazole imprinted polymers have been synthesized by the precipitation polymerization protocol using methacrylic acid as functional monomer and either ethyleneglycol dimethacrylate (EDMA) or divinylbenzene (DVB) as cross-linkers. It has been demonstrated that both polymers are able of selectively rebinding thiabendazole and other benzimidazole compounds commonly used as fungicides or anthelmintics in water samples. As the DVB-based imprinted polymer presented a much higher breakthrough volume compared to that of EDMA-MIP, this polymer was selected as selective sorbent for the multiresidual determination of benzimidazole compounds in water samples.*

*Two enrichment procedures of the water samples have been developed, the first one consisting on an off-line MISPE of the water samples and subsequent analysis of benzimidazole compounds by reversed phase HPLC-UV and the second one based on the on-line enrichment of the water samples on a MIP-LC column. The developed procedures have been successfully applied to the quantification of seven benzimidazole compounds (albendazole, benomyl, carbendazim, fenbendazole, flubendazole, fuberidazole and thiabendazole) in tap, river and well water samples.*

*Finally, a capillary electrochromatographic procedure has been developed for the direct analysis of thiabendazole in citrus samples. For this purpose, different imprinted monoliths have been synthesized and evaluated in order to optimize the selective retention of thiabendazole*

*present in citrus samples. The optimum imprinted monolith has proven to be extremely selective, enabling direct separation of thiabendazole from matrix compounds inside the MIP-capillary columns, thus enabling its quantification in crude citrus sample extracts at concentration levels below the legislated MRLs, without the need for any additional sample clean-up. A very high sample throughput can be afforded by the developed methodology.*

*It is important to mention that this last work couldn't have been performed without the methodology learnt at AstraZeneca (Mölndal, Sweden) during the time period Sep-Nov 2005.*





## *II. OBJECTIVES*



## II. OBJECTIVES

*The use of pesticides in the last decades has undoubtedly pushed forward agricultural productivity up to levels unbelievable just a few years ago. Their persistence in the environment and their massive use in recent years have led into the accumulation of these compounds in waterstreams and soils. Additionally, it has been demonstrated that most pesticides can not only enter the trophic chain, but can also bioaccumulate in the living organisms. Although many public benefits have been realized by the use of pesticides, their potential impact in both the environment and public health cannot be disregarded. In order to control the amount of pesticides to be used under certain circumstances and the maximum residue limits (MRLs) that can be tolerated in water or food, legislation is under continuous revision by environmental protection agencies worldwide.*

*As lower MRLs are being legislated daily, analytical chemists' must invest a lot of effort in the development of new analytical methodologies. Both clean-up and enrichment methodologies must thus be considerably improved in order to enable the quantification of pesticide residues in very complex samples at very low concentration levels.*

*In recent years, molecularly imprinting technology has been regarded as a very powerful analytical tool for both sample clean-up and enrichment procedures, owing to their ability of selectively rebinding the target molecule and structurally related compounds.*

*Taking all these comments into account, the main objectives of the present Thesis have been:*

- 1.- Synthesis and characterisation of new imprinted materials for the selective rebinding of triazinic herbicides.*
- 2.- Synthesis and characterisation of new imprinted materials for the selective rebinding of benzimidazole fungicides.*
- 3.- Development of new analytical methodologies based on the above imprinted materials for the determination of triazines and benzimidazoles in water, soils and vegetable samples at concentration levels below the legislated maximum residue limits (MRLs).*



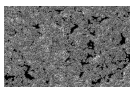
### *III. INTRODUCCIÓN*



# *1. POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR*





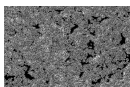


## *1.1.- CONCEPTOS GENERALES*

Uno de los principales problemas con los que se encuentra el químico analítico en la determinación de los contenidos de pesticidas en el medio ambiente es la complejidad de las muestras a analizar. Es por ello que en la mayoría de las ocasiones, además de la inevitable etapa de extracción de los analitos, es necesario realizar una etapa de limpieza adicional de los extractos obtenidos, con objeto de eliminar la mayor parte de los compuestos presentes en la matriz que pueden interferir en la determinación final. Esta etapa de limpieza de las muestras será tanto más eficaz cuanto más selectivo sea el material empleado en dicho proceso.

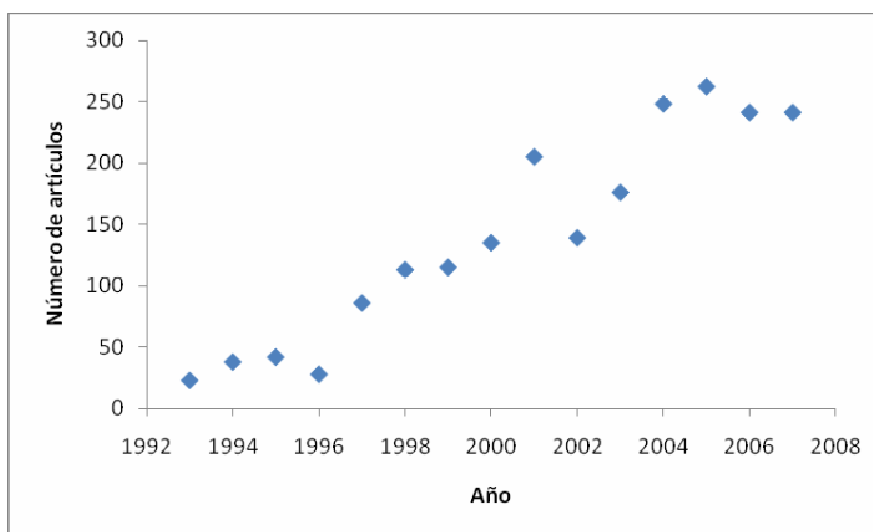
El reconocimiento molecular selectivo es una de las claves fundamentales en el funcionamiento de los sistemas biológicos. Así, por ejemplo, este tipo de reconocimiento interviene en la formación de los complejos entre enzimas y sustratos, en la interacción entre antígenos y anticuerpos, en la replicación de las moléculas de ADN o en la transcripción de las proteínas. Estos sistemas han sido el punto de partida para la síntesis de materiales capaces de interaccionar selectivamente con los analitos. En los últimos años se ha invertido un considerable esfuerzo en la preparación de materiales biomiméticos capaces de “imitar” en cierta medida el proceso biológico de reconocimiento molecular [1-5], desarrollándose materiales basados en el empleo de éteres-corona [6], criptatos [7,8], ciclodextrinas [9] o polímeros de impresión molecular (MIPs) [5], entre muchos otros, capaces todos ellos de proporcionar un reconocimiento más o menos selectivo hacia un grupo de compuestos. A excepción de los MIPs, este tipo de materiales son caros y difíciles de sintetizar en el laboratorio.

La tecnología de impresión molecular se basa en la síntesis de polímeros altamente entrecruzados con propiedades de reconocimiento molecular selectivo hacia los compuestos para los cuales fueron generados. Dicho reconocimiento se basa en la creación, durante el proceso de polimerización, de cavidades que son complementarias, en tamaño, forma y funcionalidad química al analito que fue empleado como plantilla en la síntesis de los polímeros [10].

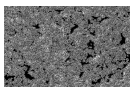


La historia de la tecnología de impresión molecular se remonta a 1931, año en el que Polyakov [11] descubrió que el gel de sílice era capaz de reconocer a determinados aditivos que estaban presentes durante la fabricación y secado del mismo. Basándose en la teoría de la formación de los anticuerpos postulada por Linus Pauling [12], Dickey fue capaz de explicar los hallazgos de Polyakov, al demostrar el reconocimiento por parte de la sílice de diferentes indicadores derivados del naranja de metilo que se encontraban presentes durante la obtención del gel de sílice [13,14]. No obstante, la baja estabilidad de este tipo de materiales limitó considerablemente el avance de esta línea de investigación [15]

En los años 70-80, los trabajos desarrollados por Wulff [16], Takagishi y Klotz [17] y Mosbach [18] demostraron la presencia de la impronta o huella molecular en polímeros orgánicos. A partir de entonces, el desarrollo de la tecnología de impresión molecular ha seguido un crecimiento progresivo, tal y como se aprecia en la figura 1.



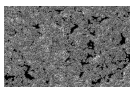
**FIGURA 1:** *Número de artículos publicados en el campo de polímeros de impresión molecular*



Una de las aplicaciones más importantes de los MIPs ha sido su empleo como adsorbentes selectivos en procesos de extracción en fase sólida para la limpieza y/o preconcentración de muestras [19-21]. Esta etapa del tratamiento de la muestra conlleva una gran dificultad y proporciona uno de los mayores problemas con los que se encuentra el químico analítico a la hora de efectuar el análisis de muestras medioambientales y agroalimentarias, entre otras. Las extraordinarias características de afinidad y selectividad de estos materiales han hecho que los MIPs hayan sustituido a los adsorbentes basados en el empleo de anticuerpos (inmunosorbentes) en numerosas ocasiones.

Otra aplicación importante de los polímeros de impresión molecular es su empleo como fases estacionarias tanto en HPLC como en electrocromatografía capilar (CEC), lo que permite unificar las etapas de la limpieza de la muestra y detección de los analitos [22,23], disminuyendo considerablemente el tiempo de análisis.

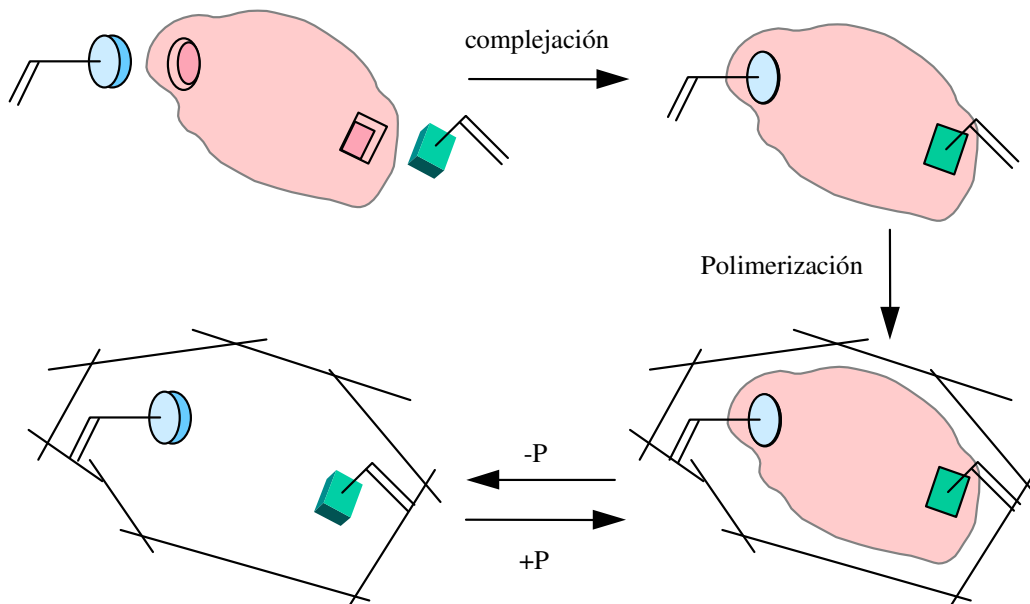
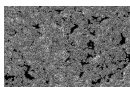
Además, los MIPs se han utilizado profusamente en la fabricación de fases selectivas para el desarrollo de sensores químicos [10,24], en síntesis orgánica para la purificación de los productos obtenidos o como catalizadores [25-27], o para la liberación retardada de productos farmacéuticos en el cuerpo humano [28].



## *1.2. - SÍNTESIS*

En términos generales, la técnica de impresión molecular se basa en la preparación de un polímero altamente entrecruzado en presencia del analito (plantilla) para el cual se desea el reconocimiento selectivo. Para ello, se pone inicialmente en contacto el analito con un monómero adecuado con el fin de formar un complejo de pre-polymerización, al que posteriormente se le añade el entrecruzante, el iniciador y el disolvente en el que se lleva a cabo la polimerización (porogen). Una vez obtenido el polímero, se extrae el analito plantilla, liberando los sitios de reconocimiento específico.

La síntesis de los MIPs consta de tres etapas básicas, que aparecen esquematizadas en la figura 2. Durante la primera etapa, se ponen en contacto el analito plantilla y el monómero, dando lugar a la formación del complejo de pre-polymerización. Es importante destacar que las propiedades del polímero obtenido dependen en gran medida del tipo de enlace formado entre el monómero y el analito plantilla y su estabilidad. En la segunda etapa se lleva a cabo la polimerización propiamente dicha. Esta polimerización generalmente sigue un mecanismo de propagación radicalico y puede estar inducida tanto térmica como fotoquímicamente. Por último, en la tercera etapa se elimina el analito plantilla de la matriz polimérica, liberando así las cavidades creadas en la matriz que son complementarias en tamaño, forma y funcionalidad química al analito plantilla. La presencia de estas cavidades, teóricamente, hace que el polímero impreso sea capaz de reconocer de forma selectiva tanto al analito plantilla como a otros compuestos estructuralmente análogos.

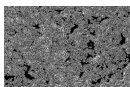


**FIGURA 2:** *Etapas implicadas en la síntesis de polímeros de impresión molecular (P = analito plantilla)*

### **1.2.1. - MODELOS EMPLEADOS EN LA SÍNTESIS DE MIPs**

La naturaleza de la interacción entre el monómero y el analito plantilla es actualmente uno de los criterios más empleados para la clasificación de los MIPs, ya que afecta considerablemente a las propiedades del polímero final obtenido. Así, es posible distinguir entre polímeros covalentes, semi-covalentes y no covalentes [29], cuyas principales características se describen a continuación.

Los **polímeros covalentes** se caracterizan porque la unión se realiza a través de un enlace covalente entre el analito plantilla y el monómero, tanto durante la polimerización, como en el reconocimiento posterior de los analitos. En la mayoría de los casos, las plantillas empleadas han sido sintetizadas en el laboratorio partiendo de moléculas con grupos dioles en su estructura capaces de formar ésteres cíclicos con monómeros que contengan ácido bórico.

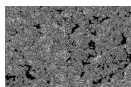


La ventaja fundamental de este tipo de polimerización reside en su extraordinaria selectividad, ya que al realizarse la síntesis en condiciones estequiométricas, no hay monómeros fuera de las cavidades, lo que minimiza considerablemente la presencia de interacciones inespecíficas [29]. Otra ventaja importante de estos polímeros es su elevada homogeneidad, lo que en principio es de gran interés para determinadas aplicaciones, como son su empleo como fases estacionarias en HPLC [30-32] o en el desarrollo de sensores químicos [33-35].

Entre los principales inconvenientes de los polímeros covalentes se encuentran, por un lado, el limitado número de monómeros existentes capaces de formar un enlace covalente reversible con el analito plantilla y, por otro, el impedimento estérico que supone la necesidad de formar un enlace covalente entre el monómero y el analito plantilla, al imponer serias restricciones en la disposición espacial de los grupos funcionales de ambos compuestos.

Además, la síntesis de estos polímeros es considerablemente más compleja que la de los polímeros no covalentes, ya que se requiere de la síntesis previa del compuesto “analito (plantilla) – monómero”, así como un tratamiento químico agresivo con objeto de romper el enlace covalente formado y eliminar el analito plantilla, liberando las cavidades responsables del posterior reconocimiento en la matriz polimérica. Por último, la mayor parte de los enlaces covalentes empleados en este tipo de polimerización son inestables en medio acuoso, lo que limita considerablemente los procedimientos de polimerización disponibles. Debido a estas limitaciones, y a pesar de haber sido los primeros polímeros en desarrollarse [16,17], su aplicación analítica ha sido considerablemente escasa.

Los polímeros **semi-covalentes** se pueden considerar como un caso particular de polímeros covalentes. En este sentido, aunque la interacción inicial formada entre el analito plantilla y el monómero es a través de un enlace covalente, la interacción implicada en el reconocimiento posterior de los analitos es de naturaleza no covalente. Este hecho es de considerable importancia, puesto que al eliminar la necesidad de formar un enlace covalente reversible durante la utilización del polímero, se pueden



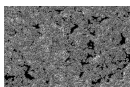
emplear otro tipo de monómeros y/o analitos plantilla que den lugar a la formación de un enlace covalente más fuerte y estable durante la síntesis del MIP [29]. Así, por ejemplo, la formación de un enlace de tipo éster se ha aplicado con éxito a la síntesis de polímeros impresos semi-covalentes capaces de reconocer, entre otros analitos, testosterona [36], bisfenol A [37], 4-nitrofenol [38] o esteroides [39]. En aquellos casos en los que la hidrólisis del enlace éster no sea posible, se puede recurrir a una reducción del mismo con  $\text{LiAlH}_4$  [39].

Los polímeros semi-covalentes fueron inicialmente descritos por Sellergren y Andersson en 1990 [40], los cuales sintetizaron un polímero impreso a partir del acetato de p-aminofenilalanina. Tras la hidrólisis de la plantilla del enlace amida formado entre el monómero y el analito plantilla, los restos de ácido carboxílico presentes en la matriz polimérica eran capaces de interactuar con el aminoácido mediante la formación de enlaces por puente de hidrógeno.

Al presentar una primera etapa común durante la síntesis del polímero, los polímeros semi-covalentes presentan varias ventajas análogas a las descritas anteriormente para el caso de los polímeros covalentes, es decir, su extraordinaria selectividad y una mayor homogeneidad en la distribución de puntos de unión en la matriz polimérica. El principal inconveniente de este tipo de polímeros deriva de las diferencias estéricas entre los enlaces covalente y no covalente, ya que se necesita una mayor distancia para formar el enlace no covalente que uno covalente.

Esta limitación que presentan en algunos casos los polímeros impresos semi-covalentes fue elegantemente resuelta por Whitcombe [41], el cual sintetizó en 1995 un polímero impreso utilizando el grupo carbonilo como espaciador entre el monómero funcional (ácido metacrílico) y el analito plantilla (colesterol). Dicho grupo espaciador se eliminó posteriormente en forma de  $\text{CO}_2$  durante la hidrólisis del enlace formado entre el analito plantilla y el monómero. La comparación de este polímero con uno sintetizado siguiendo una polimerización no covalente demostró su mayor eficacia al emplearse como fase estacionaria en sistemas cromatográficos [42].





La metodología desarrollada por Whitcombe se ha aplicado con éxito a la síntesis de polímeros impresos semi-covalentes capaces de reconocer, entre otros muchos compuestos, nandrolona [43], propofol [44] y bisfenol A [45].

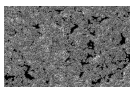
Los **polímeros no covalentes** son aquellos en los que la interacción entre el analito plantilla y el monómero tiene lugar a través de la formación de enlaces intermoleculares débiles, tipo puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas o fuerzas de Van der Waals, tanto durante la síntesis del polímero como durante el reconocimiento posterior de los analitos. Debido a la amplia disponibilidad comercial de monómeros y analitos capaces de dar lugar a una interacción estable de este tipo, junto a la facilidad de la síntesis de estos materiales, los polímeros no covalentes son, sin lugar a dudas, los más empleados en la actualidad [46].

En el primer trabajo realizado por Arshady y Mosbach [47] se describe la preparación de un polímero impreso no covalente sintetizado empleando metacrilato de metilo como monómero funcional que, mediante fuerzas electrostáticas, forma un complejo de prepolimerización con N,N'-fenildiacrilamida. La selectividad del polímero creado se demostró mediante una exhaustiva evaluación cromatográfica.

Entre los principales inconvenientes de este tipo de materiales se encuentran su menor selectividad, que conduce a la co-elución de especies interferentes en muestras complejas cuando se emplean como fases estacionarias en HPLC o electrocromatografía capilar [48], y la menor homogeneidad en la distribución de los puntos de unión presentes en la matriz polimérica [49], lo que da lugar a un ensanchamiento de los picos cromatográficos o empeora la linealidad de los sensores [46].

### **1.2.2. OPTIMIZACIÓN DE LA SÍNTESIS DE MIPs**

Entre los parámetros a optimizar en la síntesis de los MIPs se encuentran: naturaleza y cantidad de monómero, iniciador, entrecruzante y porogen, la forma de iniciar la polimerización y la metodología empleada [50-52].

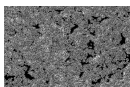


Debido al elevado número de variables que pueden influir en las características del polímero final obtenido, la optimización del proceso de síntesis resulta considerablemente complejo. En la actualidad se han desarrollado tres tipos de aproximaciones para facilitar dicha optimización: el empleo de los denominados mini-MIPs, el diseño de experimentos o el estudio de la dinámica molecular de la interacción del analito plantilla con diferentes polímeros previamente modelizados.

El empleo de **mini-MIPs** fue desarrollado por los grupos de Takeuchi [53] y Sellergren [54]. Brevemente, esta técnica se basa en el empleo de un dispensador automático de disoluciones, capaz de mezclar un pequeño volumen de cada uno de los reactivos que intervienen en la polimerización en diferentes viales, con una variación sistemática de las mezclas empleadas en la síntesis de los polímeros. Después de la extracción del analito plantilla mediante repetidos lavados de los polímeros, se aplica un método de “screening”, ya sea secuencial o en paralelo, con el objeto de evaluar el funcionamiento de los diferentes polímeros obtenidos. Posteriormente se sintetizarán mayores cantidades de aquellos polímeros para los que se haya obtenido un mayor grado de reconocimiento para una evaluación más detallada.

En el caso de la aproximación de los mini-MIPs, debido al elevado número de mezclas a evaluar, éstas se preparan habitualmente de forma automática. En el caso de que las diferentes mezclas se preparasen manualmente, el número de polímeros a evaluar disminuiría considerablemente debido al elevado tiempo que se consume en la preparación y evaluación de cada uno de ellos [55].

El principal inconveniente de este método de optimización reside en las diferencias que existen entre el comportamiento del polímero impreso en las condiciones de equilibrio empleadas en la caracterización y optimización del reconocimiento de los analitos, y en condiciones de no-equilibrio, tales como las presentes en los sistemas cromatográficos, lo que hace que no siempre sea posible extrapolar los resultados obtenidos [53]. Además, el elevado número de combinaciones posibles que pueden tener lugar limita considerablemente el número de variables que se pueden optimizar simultáneamente.



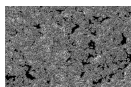
Por el contrario, el empleo de **métodos quimiométricos** basados en diseños experimentales permite la optimización de un elevado número de variables de manera simultánea. En este caso, se genera una matriz multidimensional que incluye todas las posibles variaciones de todos los parámetros que pueden influir sobre el funcionamiento del polímero. Una vez creada esta matriz, se seleccionan unos pocos experimentos representativos siendo éstos los que se preparan y caracterizan. El análisis multivariante de los resultados obtenidos para los polímeros impresos así seleccionados permite obtener las superficies de respuesta, que sirven para predecir el procedimiento óptimo para la obtención del polímero impreso [56,57].

Por último, la **modelización molecular** de los MIPs permite evaluar un número elevado de posibles polímeros impresos, sin tener que sintetizarlos en el laboratorio. Esta técnica se basa en el estudio de la fuerza de los enlaces que se formarían entre el analito plantilla y los monómeros simulando las diferentes condiciones experimentales empleadas durante la polimerización [58,59]. De esta forma, es posible predecir el comportamiento de los diferentes polímeros propuestos, sintetizándose únicamente aquellos para los que se ha establecido un enlace lo suficientemente fuerte que garantice en algún modo la estabilidad de la impresión. La comparación de los resultados obtenidos experimentalmente con los predichos a partir del modelo de modelización molecular es generalmente satisfactoria [60].

A continuación se detallan los distintos factores que influyen en el proceso de reconocimiento de los MIPs, describiéndose algunos ejemplos y particularidades.

### **Monómero funcional**

En general, se puede afirmar que la selección del tipo de monómero más adecuado se realizará en función de las características y grupos funcionales del analito, con el que debe formar un complejo de pre-polimerización estable. Además, es deseable que entre el analito plantilla y el monómero se den interacciones complementarias que aumenten la afinidad y la selectividad de las cavidades generadas en la matriz

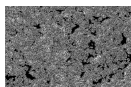


polimérica [61]. Es importante destacar que, aunque generalmente la síntesis de los MIPs se lleva a cabo utilizando un único monómero funcional, en determinados casos se puede recurrir al empleo de una mezcla de monómeros, con el objeto de mejorar la selectividad de la interacción posterior entre el polímero impreso y los analitos [62-64].

Por otra parte, para que el equilibrio se encuentre totalmente desplazado hacia la formación del complejo de pre-polimerización y se garantice de esta forma su estabilidad, se debe trabajar con un exceso de monómero, generalmente en una relación molar 1:4 (analito plantilla:monómero). No obstante, el exceso de monómero empleado queda libre en la red polimérica obtenida, lo que suele dar lugar a la formación de interacciones no específicas con el analito y con otros compuestos presentes en la muestra. Es por ello que en la práctica se deben optimizar las condiciones experimentales para garantizar la máxima selectividad de la interacción del MIP con los analitos [29,46].

Los monómeros empleados en la síntesis de **polímeros covalentes** deben ser capaces de formar un enlace covalente reversible con los analitos, que pueda romperse fácilmente durante la elución de los mismos. Así, por ejemplo, se han descrito polímeros covalentes basados en la formación de ésteres de los ácidos borónico [16,65-68] y carboxílico [69-73], bases de Schiff [74,75], cetales/acetales [76-78], hemiacetales [79] para la determinación de carbohidratos [65,80], nucleótidos [68], alcoholes [81,82] y aminoácidos [69]. De todos ellos, los polímeros basados en derivados del ácido borónico son los más empleados, ya que la interacción entre el polímero y los analitos es considerablemente más rápida, lo que facilita su empleo como fases estacionarias en procesos cromatográficos [5].

En el caso de los **polímeros no covalentes**, el número de monómeros que se han descrito es mucho más elevado, pudiendo tener naturaleza ácida, básica o neutra. A pesar de que los monómeros derivados de los ácidos carboxílicos son capaces de dimerizar en las condiciones empleadas durante la síntesis del polímero (altas concentraciones de monómero y un medio apolar), son los monómeros más utilizados en la preparación de MIPs no covalentes, debido a que son capaces de interaccionar de

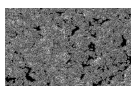


múltiples maneras con una gran cantidad de analitos plantilla. Entre los posibles mecanismos de interacción de estos ácidos destacan su carácter tanto aceptor como dador de protones en la formación de enlaces por puente de hidrógeno, la formación de pares iónicos o la interacción a través de la formación de enlaces dipolo-dipolo [29]. De todos estos compuestos, el más utilizado es el ácido metacrílico. Este compuesto presenta una mayor rigidez rotacional de los enlaces, contribuyendo a incrementar la estabilidad del complejo de prepolimerización.

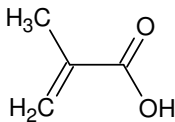
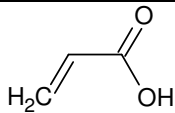
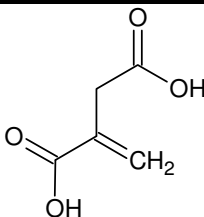
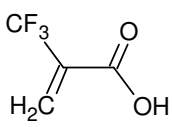
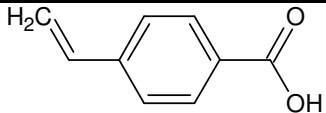
Cuando el analito empleado como plantilla es de naturaleza ácida, se puede recurrir al empleo de un monómero básico como vinilpiridina. En su forma básica, la vinilpiridina presenta un anillo aromático pobre en electrones  $\pi$  y es, por lo tanto, capaz de interaccionar muy eficientemente con analitos aromáticos ricos en electrones dando lugar a la formación de una interacción de tipo  $\pi$ - $\pi^*$ . A primera vista, esta interacción pudiera parecer interesante debido a que al ser de naturaleza apolar podría formarse en medio acuoso. No obstante, generalmente da lugar a la formación de un elevado número de interacciones inespecíficas, que dificulta considerablemente la optimización de la etapa de lavado [29].

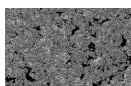
Por último, el monómero neutro más empleado es la acrilamida, que da lugar a la formación de puentes de hidrógeno más estables que el ácido metacrílico en medios apolares, siendo una buena alternativa al empleo de éste último en la preparación de fases estacionarias para HPLC [83].

En las tablas 1-3 se recogen los monómeros más utilizados para la preparación de estos materiales.



**TABLA 1: Monómeros ácidos empleados en la síntesis de MIPs**

Monómero	Fórmula	Aplicaciones
Acido metacrílico		Aminoácidos [84] Péptidos [85] Teofilina [86] Propranolol [87] Morfina [88] Monosacáridos [89] Triazinas [48] Benzimidazoles [49]
Acido acrílico		Aminoácidos [90]
Acido itacónico		Timolol [91] Norefedrina [92]
Acido trifluorometacrílico		Atrazina [93] Nicotina [94] Alcaloides de cinchona [95]
Acido p-vinilbenzoico		Aminoácidos [18]

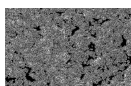


**TABLA 1 (continuación): Monómeros ácidos empleados en la síntesis de MIPs**

Monómero	Fórmula	Aplicaciones
Acido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico		Desmetrín [96]
Fosfato de 2-(metacrililoiloxi)etilo		Esteroles [97]

**TABLA 2: Monómeros básicos empleados en la síntesis de MIPs**

Monómero	Fórmula	Aplicaciones
4-vinilpiridina		Naproxeno [98] Aminoácidos [99]
Dietilaminoetilmetacrilato		Atrazina [100]
Dimetilaminoetilmetacrilato		Compuestos ácidos [101]
p-aminoestireno		Colorantes alimenticios [102]



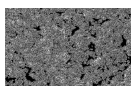
**TABLA 2 (continuación): Monómeros básicos empleados en la síntesis de MIPs**

Monómero	Fórmula	Aplicaciones
1-vinilimidazol		Aminoácidos [99]
4(5)-vinilimidazol		ATP [103]
2,6-bisacrilamidopiridina		Barbitúricos [104]

**TABLA 3: Monómeros neutros empleados en la síntesis de MIPs**

Monómero	Fórmula	Aplicaciones
Acrilamida		Aminoácidos [105]
Metacrilamida		Fenitoína [106]
2-hidroximetilmetacrilato		AMP [107] Efedrina [108] Colesterol [109]
N,O-bismetacriloil etanolamina		Empleo como entrecruzante en la preparación de OMNiMIPs [110]

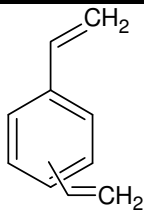
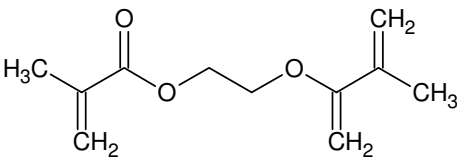
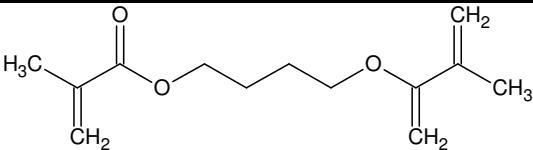
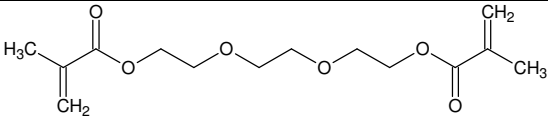


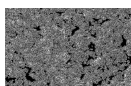


### Entrecruzante

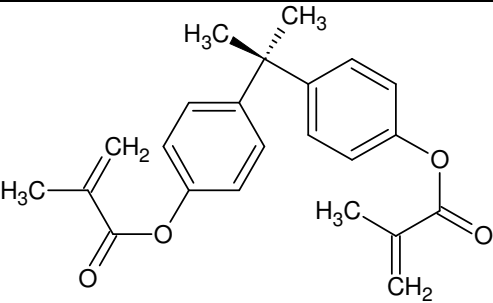
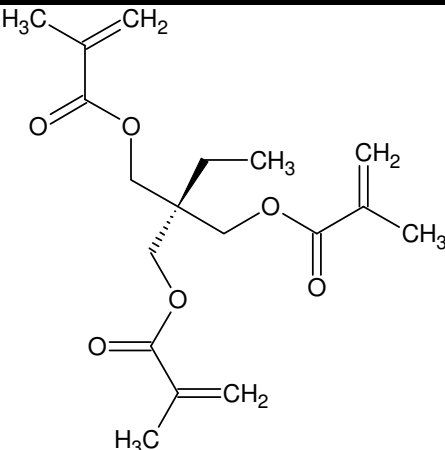
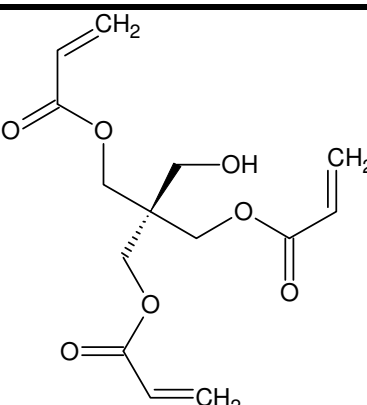
La integridad estructural del complejo de pre-polimerización y, por lo tanto la obtención de cavidades bien definidas en la red polimérica, depende directamente de la naturaleza y de la cantidad de entrecruzante empleado [61]. Este entrecruzante debe ser capaz de interactuar con el complejo de pre-polimerización y preservarlo durante la síntesis del polímero. Sus funciones más representativas son: (a) es el principal responsable de la morfología de la matriz polimérica, (b) estabiliza los sitios de unión selectiva, (c) confiere estabilidad mecánica y térmica al polímero sintetizado y (d) proporciona la porosidad adecuada para garantizar la accesibilidad del analito a las cavidades generadas [10]. Los entrecruzantes más empleados se muestran en la tabla 4.

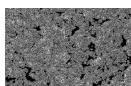
**TABLA 4: Entrecruzantes empleados en la síntesis de MIPs**

Entrecruzante	Fórmula	Aplicaciones
Divinilbenceno		Nicotina [111] Bilirrubina [112]
Etilenglicol – Dimetacrilato (EDMA)		Triazinas [48,113] Tiabendazol [114]
1,4-butanodiol – dimetacrilato		Fenilalanina [115]
Trietilenglicol – Dimetacrilato		Atrazina [116]



**TABLA 4 (continuación): Entrecruzantes empleados en la síntesis de MIPs**

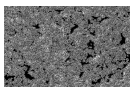
Entrecruzante	Fórmula	Aplicaciones
Bisfenol A – Dimetacrilato		Enantiómeros [117]
Trimetilolpropano trimetacrilato (TRIM)		Estradiol [118] Zearalenona [119]
Pentaeritritol triacrilato		Efedrina [120] Aminoácidos [121]



**TABLA 4 (continuación): Entrecruzantes empleados en la síntesis de MIPs**

Entrecruzante	Fórmula	Aplicaciones
Pentaeritritol tetracrilato		Aminoácidos [121]
Metilen-bis-acrilamida		Proteínas [122]
Etilen-bis-acrilamida		Aminoácidos [123]
1,4-diacriloilpiperazina		Fenilalanina [124]
N,N'-bis-(acriloil)cistamina		Calcio [125]

Como puede apreciarse en esta tabla, hay entrecruzantes de muy diversa naturaleza: derivados del estireno (divilbenceno), derivados del ácido metacrílico (etilenglicoldimetacrilato, 1,4-butanodiol dimetacrilato, trietilenglicol dimetacrilato, bisfenol A dimetacrilato, trimetilolpropano trimetacrilato, pentaeritritol trietacrilato o



tetracrilato...), solubles en agua (metilen- y etilen-bis-acrilamida, 1,4-diacriloilpiperazina) y derivados de aminoácidos (N,N'-bis-(acriloil)cistamina). Entre los más utilizados se encuentran etilenglicol dimetacrilato (EDMA), divinilbenceno (DVB) y trimetilolpropano trimetacrilato (TRIM).

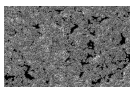
### Disolvente o porogen

El disolvente o “porogen” se elige en función de su capacidad para estabilizar el complejo de pre-polimerización formado entre el monómero funcional y el analito plantilla. De esta forma, se eligen disolventes apróticos o de baja constante dieléctrica, como el tolueno, el cloroformo o el acetonitrilo, para estabilizar complejos basados en la formación de enlaces por puente de hidrógeno o fuerzas electrostáticas. Los disolventes próticos como el agua o el metanol tienden a desestabilizar dichas uniones, dificultando la formación de cavidades en la matriz polimérica, pero son los adecuados cuando las interacciones son de tipo hidrofóbico [50].

Si el polímero se va a emplear como fase estacionaria en técnicas de separación como electrocromatografía capilar, la porosidad del polímero obtenido se controla mediante la adición de una pequeña fracción de isooctano al porogen. Así, por ejemplo, estudios recientes [126] han demostrado que la adición de una pequeña fracción de isooctano al tolueno empleado comúnmente como porogen no afecta al reconocimiento y aumenta considerablemente la porosidad de los monolitos obtenidos por la generación de macroporos. La presencia de estos macroporos en la matriz polimérica facilita el acondicionamiento de los capilares al permitir el bombeo hidrodinámico de la disolución de electrolito.

### Iniciador

El iniciador es el responsable del comienzo de la polimerización al introducir radicales en el sistema. Su elección depende de cuál sea el método de iniciación que se



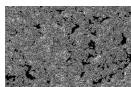
vaya a emplear, radiación ultravioleta o por acción del calor y, en este último caso, de la temperatura a la cual se lleva a cabo la polimerización. Estos parámetros afectan fundamentalmente al tiempo necesario para que tenga lugar la solidificación del polímero. La temperatura de la polimerización se elige en función de la estabilidad térmica del iniciador, que debe fragmentarse para que comience el proceso de polimerización [52]. En general, se ha demostrado que la descomposición de los iniciadores de tipo azoico es considerablemente más rápida en el caso de la iniciación fotoquímica, especialmente si la lámpara de radiación UV es de elevada potencia [127].

El iniciador más comúnmente empleado en la preparación de polímeros de impresión molecular es el azo-bis-isobutironitrilo (AIBN), el cual se descompone en radicales tanto por la acción de radiación ultravioleta como por el calor a temperaturas superiores a 60°C [52].

### *Metodología de polimerización*

El método de polimerización empleado influye sobre la morfología del polímero obtenido, pudiéndose obtener partículas esféricas mono- o polidispersas, partículas de tamaño de poro controlado, agregados aleatorios de partículas, bloques, etc.

Es importante mencionar que el método de polimerización también puede afectar al reconocimiento de los analitos por parte del polímero. Así, por ejemplo, Pérez-Moral y Mayes [128] han demostrado que el método de polimerización empleado en la síntesis de polímeros de impresión molecular influye en el reconocimiento del propranolol, empleado como analito plantilla. Los procedimientos utilizados por estos autores para la preparación de estos polímeros fueron la polimerización en bloque, por suspensión, por precipitación o en presencia de una emulsión de tolueno y agua. El máximo reconocimiento se alcanzó cuando la muestra se cargó empleando el polímero obtenido por precipitación.



El método de polimerización elegido variará en función de la aplicación a la que se vaya a destinar el polímero impreso. Así, por ejemplo, se han desarrollado métodos específicos de polimerización cuando el polímero se va a utilizar como fase estacionaria en cromatografía o electrocromatografía capilar.

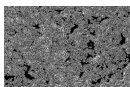
A continuación se describen los métodos de polimerización utilizados más habitualmente en la preparación de polímeros de impresión molecular en el campo de la química analítica.

#### *Polimerización en bloque:*

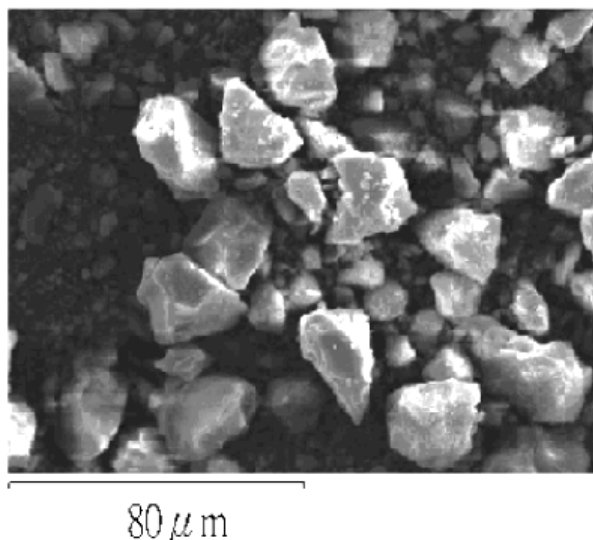
La síntesis en bloque fue el primer método empleado en la preparación de los MIPs [29]. Dicho método consiste en la polimerización radicalica de una disolución concentrada de monómeros. La mezcla del analito plantilla, monómero, entrecruzante, iniciador y porogen se somete a la polimerización, que puede estar iniciada tanto fotoquímica como térmicamente. Una vez concluida, se obtiene un monolito de polímero insoluble que se tritura y tamiza hasta obtener partículas micrométricas amorfas. Una vez obtenido el polímero, se elimina el analito plantilla liberando las cavidades responsables del reconocimiento selectivo de los analitos.

El principal inconveniente de esta metodología reside en la necesidad de triturar y tamizar el polímero hasta obtener el tamaño de partícula deseado, debido a que en dicho proceso se pierde una gran cantidad de polímero. Por ello, el rendimiento de la polimerización disminuye drásticamente.

Se han descrito numerosos trabajos basados en el empleo de MIPs sintetizados en bloque como adsorbentes selectivos en procesos de extracción en fase sólida [129-135]. No obstante, la heterogeneidad en el tamaño y la forma de las partículas de polímero (figura 3) plantea problemas a la hora de aplicar estos materiales como fases estacionarias selectivas, dando lugar a un considerable ensanchamiento de los picos



cromatográficos, o en el desarrollo de sensores, ya que empeora considerablemente el intervalo de aplicación de los mismos.

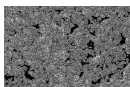


***FIGURA 3: Micrografía electrónica de un polímero de impresión molecular sintetizado mediante polimerización en bloque [136]***

Con el objeto de mejorar las propiedades de los polímeros impresos obtenidos mediante polimerización en bloque, en los últimos años se han propuesto diferentes métodos de polimerización destinados a la obtención de partículas esféricas de tamaño más o menos uniforme. Entre estos métodos se encuentran, por ejemplo, la polimerización por precipitación, polimerización por suspensión, polimerización por hinchamiento en etapas y polimerización sobre partículas de latex o sílice.

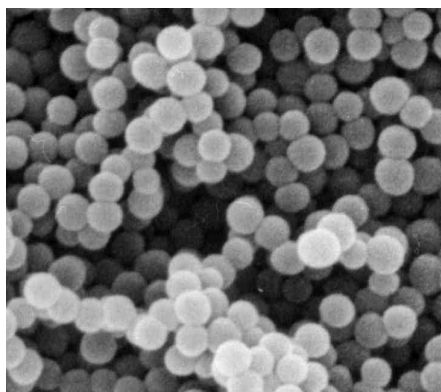
**Polimerización por precipitación:**

Esta metodología es análoga a la polimerización en bloque, si bien en este caso se emplea una mezcla de reactivos mucho más diluida al trabajar en exceso de disolvente. Como consecuencia, las cadenas poliméricas en formación no son capaces de ocupar el volumen total del disolvente, produciéndose una dispersión de partículas esféricas de polímero independientes en el seno de la disolución [137-139].



Entre las principales ventajas de esta técnica de polimerización se encuentran, además de la ya mencionada obtención de partículas esféricas, la obtención de un gran rendimiento de polimerización al no ser necesario someter el polímero obtenido a las etapas de triturado y tamizado. Además, se ha comprobado experimentalmente [140,141] que las partículas obtenidas por precipitación poseen, en comparación con las obtenidas mediante polimerización en bloque, una mayor capacidad y una distribución más homogénea de los sitios de unión.

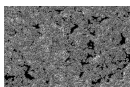
En la figura 4 se muestra la micrografía electrónica obtenida para un polímero sintetizado por precipitación. El tamaño medio de las partículas de este polímero es de 0,3  $\mu\text{m}$ .



***FIGURA 4: Micrografía electrónica de un polímero de impresión molecular sintetizado siguiendo una polimerización por precipitación [142]***

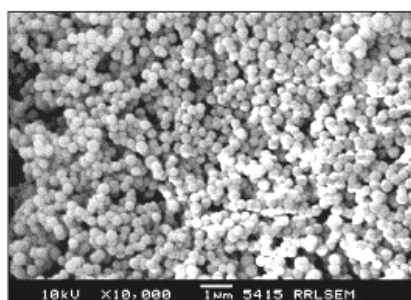
Por lo general, el tamaño de partícula obtenido mediante este procedimiento es muy pequeño (alrededor de 1  $\mu\text{m}$ ) lo que genera problemas cuando se emplea como fase estacionaria en técnicas de separación. En la actualidad, se está invirtiendo un considerable esfuerzo para incrementar el tamaño de partículas [114] y así minimizar la sobrepresión generada en las columnas cromatográficas. Una forma de controlar el tamaño de las partículas consiste en el control de la velocidad de agitación de la disolución de polimerización, siendo el tamaño de partícula tanto menor cuanto menor sea la velocidad de agitación.





*Polimerización por suspensión:*

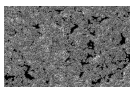
En la polimerización por suspensión, se combinan un medio orgánico hidrofóbico, en el que se encuentra la mezcla de polimerización, y un medio dispersante orgánico o acuoso inmiscible con el anterior. El empleo de una fase acuosa es mucho menos frecuente ya que puede dificultar seriamente la interacción entre el analito y el monómero. Los dispersantes más empleados son líquidos perfluorados por su elevado carácter hidrofóbico. La mezcla de ambos medios se agita, creándose unas micro-gotas en suspensión en las que tiene lugar la polimerización (figura 5) [143]. La principal ventaja de este procedimiento es que permite controlar el tamaño de las partículas, ya sea mediante la adición de un estabilizador (polivinilalcohol o líquidos iónicos) o por el control de la velocidad de agitación [144-146].



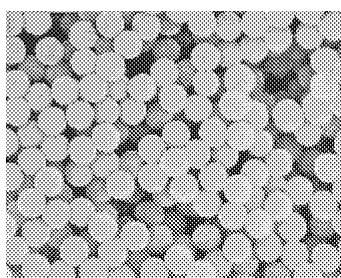
**FIGURA 5: Micrografía electrónica de un polímero de impresión Molecular sintetizado por suspensión [143]**

*Polimerización por hinchamiento en dos etapas:*

El método de polimerización por hinchamiento en dos etapas fue inicialmente descrito en 1994 por Hosoya y col. [147]. Este método se basa en la síntesis de partículas esféricas de latex en medio acuoso y posterior hinchamiento de las mismas por la formación de una microemulsión mediante la adición de dibutil ftalato como agente plastificante. A continuación, las partículas de latex se impregnan con la mezcla de pre-polimerización, de forma que se sintetiza una capa de polímero en su superficie.



Este método produce partículas monodispersas de tamaños comprendidos entre 2 y 50  $\mu\text{m}$  (figura 6) [148]. Los principales inconvenientes son, por un lado la complejidad del mismo y, por otro que, al llevar a cabo la síntesis en medio acuoso, la interacción mediante la formación de enlaces por puente de hidrógeno entre el analito plantilla y el monómero estaría desfavorecida en el caso de emplear la síntesis no covalente.

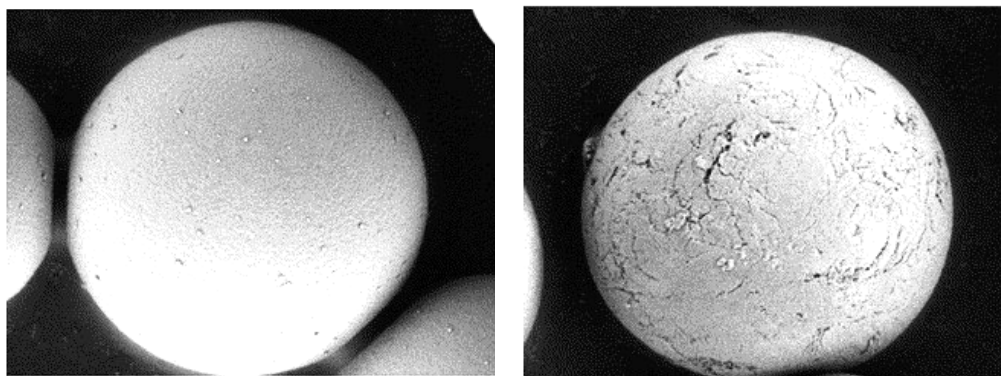
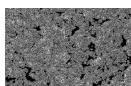


**FIGURA 6:** *Micrografía electrónica de un polímero de impresión molecular sintetizado sobre partículas de latex* [148]

*Polimerización en partículas de sílica:*

Otro método para la obtención de partículas esféricas es la polimerización en el interior de partículas esféricas de sílica de tamaño conocido y posterior redisolución de las mismas. Este procedimiento consiste en la impregnación de las partículas de sílica con la disolución de polimerización. La principal dificultad de este método reside en el estricto control del volumen de disolución de polimerización empleado, ya que no debe ser superior al volumen total de los poros de las partículas de sílica. En este sentido, un exceso de volumen provocaría la polimerización en el exterior de las partículas de sílica, así como la formación de agregados de partículas.

En la figura 7 se muestran las micrografías electrónicas de las partículas de sílica y el polímero impreso sintetizado en el interior de las mismas, una vez redisuelta la sílice. Tal y como puede apreciarse, el cuidadoso control del volumen de la disolución de polimerización permite obtener partículas de polímero de idéntica forma y tamaño a las partículas de sílica originales.



A

B

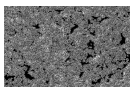
**FIGURA 7: Micrografías electrónicas de una partícula de sílica (A) y una partícula de polímero de impresión molecular (B) sintetizado en el interior de la sílica [149]**

#### Técnicas de injerto:

Las técnicas de injerto ofrecen una interesante alternativa a la síntesis de polímeros de impresión molecular utilizando partículas [150] o membranas [151] como soporte para llevar a cabo la polimerización. En esta técnica se diferencian dos modalidades:

*“Grafting to”*: En esta modalidad, se realiza la polimerización sobre una superficie poniendo en contacto la mezcla de polimerización y la superficie modificada por inmovilización del monómero y se procede a la polimerización, dando lugar a la formación de una capa de MIP sobre la superficie. Esta técnica se ha empleado fundamentalmente en la preparación de polímeros impresos para la determinación de proteínas [152,153] Esta técnica presenta el inconveniente de la falta de control sobre el espesor de la capa de polímero impreso.

*“Grafting from”*: Esta metodología surge con la intención de mejorar la transferencia de masa y capacidad de saturación de los polímeros preparados mediante la metodología anterior. En este caso, el compuesto inmovilizado sobre la superficie del material es el iniciador, de forma que el crecimiento de las cadenas poliméricas ocurre siempre desde



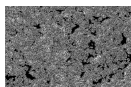
la superficie del soporte, lo que permite un mayor control tanto del grosor de la capa de polímero formada como de su densidad. Los indicadores inmovilizados pueden ser de tipo azoico [154-156] o los denominados “*iniferter*” [157]. Los *iniferter* son iniciadores radicalícos asimétricos que al fragmentarse se descomponen en dos radicales, uno capaz de iniciar la polimerización y otro que favorece la recombinación entre radicales dando lugar a la finalización de la polimerización. Por su naturaleza, los *iniferter* son los únicos iniciadores capaces de evitar la polimerización en el seno de la disolución, facilitando por tanto un control más estricto del grosor de la capa de polímero creada y una mejor transferencia de masa.

### *Síntesis de MIPs en columnas capilares*

El empleo de los polímeros de impresión molecular como fases estacionarias en electrocromatografía capilar presenta las ventajas de unir la eficacia de la separación electroforética y la selectividad del reconocimiento en el MIP. Por otra parte, la preparación de columnas capilares rellenas es un proceso sencillo, rápido y económico.

En los últimos años se han descrito diferentes procedimientos para la obtención de columnas capilares rellenas con un polímero de impresión molecular, que abarcan tanto la síntesis del polímero y posterior empaquetamiento en el interior de la columna como la síntesis “*in situ*” de los polímeros impresos. A continuación se describen brevemente los principales procedimientos empleados para la preparación de estas columnas capilares.

Los **capilares empaquetados** siguen siendo el formato más habitual en la obtención de columnas capilares para electrocromatografía capilar. Generalmente constan de dos zonas claramente definidas, una en la que hay fase estacionaria y otra en la que no, como por ejemplo en la zona de detección. Debido a que la obtención de la fase estacionaria se lleva a cabo fuera del capilar, la preparación del polímero puede realizarse mediante cualquiera de las metodologías descritas previamente, tales como la polimerización en bloque, por precipitación, sobre partículas de latex o sílice... La fase



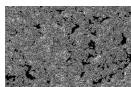
estacionaria empaquetada dentro del capilar se mantiene dentro del mismo retenida por fritas [158] o atrapada en un gel de acrilamida o sílice [159].

Este formato presenta como principales ventajas la posibilidad de controlar cuidadosamente el tamaño de las partículas de fase estacionaria, su porosidad y el tipo de interacción que tiene lugar con los analitos. Sin embargo, la necesidad de emplear fritas para contener la fase estacionaria plantea numerosos inconvenientes como son la formación de burbujas que interrumpen la transmisión del campo eléctrico, el ensanchamiento de los picos, o los cambios de morfología y porosidad entre los materiales de la frita y la fase estacionaria. Es por ello que actualmente se tiende hacia la búsqueda de formatos alternativos en los que no se requiera del empleo de fritas.

Las columnas rellenas con MIPs con formato **monolito** permiten eliminar la necesidad de emplear fritas de contención y facilitan el proceso de llenado del capilar, ya que generalmente la polimerización del monolito se lleva a cabo directamente en su interior. Por ello, los monolitos constituyen una excelente alternativa al empleo de los capilares empaquetados. Por otra parte, el control de la porosidad de los monolitos no resulta difícil, pudiéndose obtener desde estructuras rígidas a geles mediante la simple variación de las condiciones empleadas en su síntesis.

Para la preparación de los monolitos se bombea la disolución de polimerización a través del capilar. A continuación, se cubren con papel de aluminio las zonas del capilar dónde se quiera evitar la síntesis del polímero, como por ejemplo en la ventana de detección, minimizando de esta forma los problemas de dispersión de la radiación debido a la presencia de polímero en esta zona. La polimerización se lleva a cabo sometiendo el capilar a la acción de la radiación ultravioleta. Por último, se elimina el analito plantilla bombeando la disolución adecuada (generalmente una mezcla de ácido acético y metanol) a través del capilar.

En la bibliografía se han descrito dos métodos para controlar la porosidad de los monolitos obtenidos. El primero de ellos [160] consiste en el control estricto del tiempo de polimerización, mientras que el segundo [126,161] se basa en la adición de un



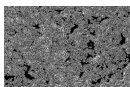
disolvente que induzca la terminación de la polimerización como puede ser el iso-octano. Aunque en principio la adición de iso-octano puede afectar al reconocimiento posterior de los analitos, se ha demostrado la existencia de reconocimiento selectivo en polímeros sintetizados en presencia de hasta un 20% de iso-octano [126].

La preparación de monolitos de MIPs en el interior de columnas cromatográficas o capilares permite obtener fases estacionarias de mayor porosidad y permeabilidad que las obtenidas por el empaquetamiento clásico de partículas. Este tipo de fases estacionarias no ha encontrado todavía mucha aplicación en HPLC, si bien se ha aplicado extensamente a la preparación de columnas capilares para electrocromatografía capilar (CEC).

En los **capilares recubiertos**, la fase estacionaria se enlaza a las paredes del capilar, de forma que el polímero se localiza únicamente en esa zona. La fase estacionaria puede estar adsorbida [162] o unida covalentemente [163-165] a la pared del capilar.

La preparación de capilares recubiertos con una capa de polímero generado por impresión molecular implica aplicar una técnica de injerto como las descritas anteriormente que posibilita que no haya polimerización fuera de la pared del capilar. Hay que introducir una etapa previa de inmovilización del iniciador sobre la superficie del capilar. Esta inmovilización se lleva a cabo manteniendo 16 horas en contacto el capilar previamente derivatizado con una disolución tamponada a pH 5,5 de ácido 4,4'-azobis(4-cianopentanóico) (ACPA, 10 mM) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC, 20 mM) en metanol [166]. Una vez inmovilizado el iniciador, se bombea la disolución de polimerización a través del capilar y se sintetiza el polímero de un modo análogo al empleado para la síntesis de monolitos.

Esta técnica presenta la ventaja de la simplicidad en la preparación de las columnas capilares, la facilidad en la regeneración de la columna y la eliminación de los problemas debidos al atasco de las columnas con la fase estacionaria cuando se utilizan los formatos de capilares empaquetados o monolito. Por el contrario, presenta el

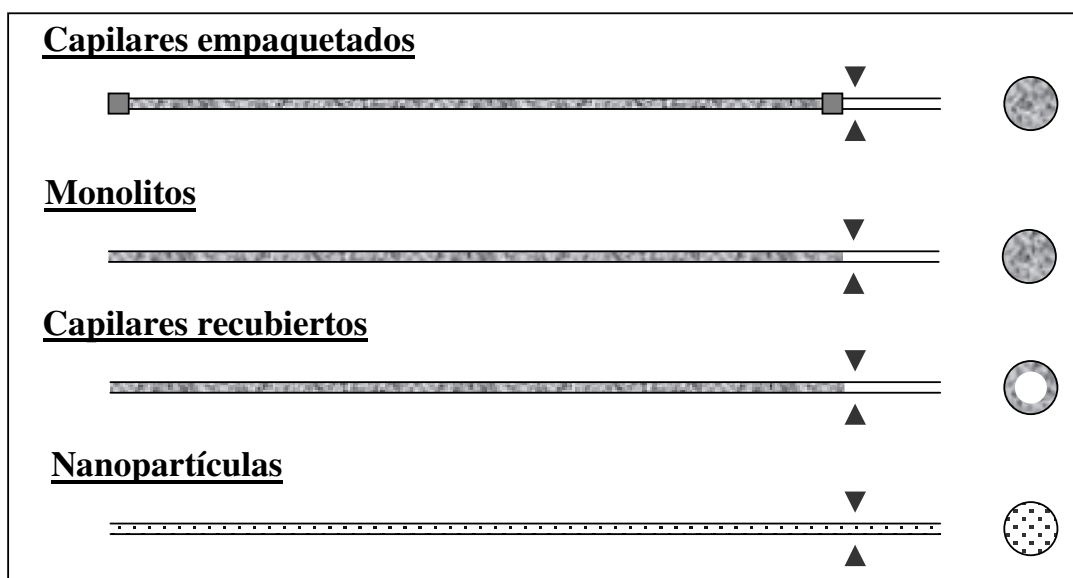
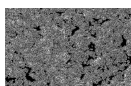


inconveniente de que la capacidad de la columna es muy limitada debido a la escasa cantidad de polímero presente en el interior del capilar, lo que en muchas ocasiones limita el análisis de las muestras, haciendo necesario poder llevar a cabo un proceso de preconcentración.

Por último, el empleo de **nanopartículas** de MIPs es la forma más simple de llevar a cabo la separación de los analitos mediante MIP-CEC, debido a que no se requiere de ningún tipo de inmovilización del polímero en el interior del capilar. En este caso, las nanopartículas se añaden al electrolito y actúan como una fase pseudo-estacionaria de una manera análoga al funcionamiento de las micelas en la cromatografía electrocinética micelar (MEKC). Aunque generalmente se rellena todo el capilar con nanopartículas de polímero, en el caso de que fase estacionaria empleada sea cara o de lugar a problemas de absorción de radiación durante la detección de los analitos puede recurrirse a rellenar tan sólo una parte del mismo [167].

La principal ventaja del empleo de nanopartículas de polímero es que permite renovar el polímero empleado entre medidas sucesivas, lo que constituye una clara ventaja desde el punto de vista de la optimización del método de separación. Además, la cantidad de polímero introducida en el interior del capilar puede controlarse rigurosamente, disminuyendo la falta de reproducibilidad asociada a diferencias en la cantidad de polímero presente en las columnas cuando se emplea cualquiera de los formatos descritos anteriormente.

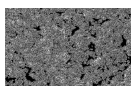
En la figura 8 aparecen representados los distintos formatos de columnas capilares empleados en electrocromatografía capilar.



**FIGURA 8:** *Formatos de columnas capilares empleados en electrocromatografía capilar utilizando polímeros de impresión molecular como fase estacionaria*

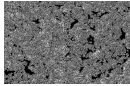
A modo de resumen, en la tabla 5 se recogen algunos de los métodos de polimerización que aparecen descritos en la bibliografía para la síntesis de MIPs.





**TABLA 5: Métodos de polimerización de MIPs**

Método de polimerización	Morfología	Referencia
Bloque	Agregados aleatorios de partículas esféricas (después de triturar y tamizar)	[168]
Precipitación	Partículas esféricas polidispersas	[169]
	Nanopartículas	[167, 170-173]
Suspensión en agua	Partículas esféricas polidispersas	[174]
Suspensión en perfluorocarbono	Partículas esféricas polidispersas	[175]
Hinchamiento en etapas	Partículas esféricas monodispersas	[176]
Sobre superficie de látex	Partículas esféricas monodispersas	[148]
En partículas de sílice	Partículas esféricas monodispersas de porosidad controlada	[177]
In situ	Monolitos	[64,160,161,178, 179, 180-184]
	Capilares recubiertos	[166,185-187]



### *1.3. - CARACTERIZACIÓN*

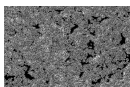
En los últimos años se han empleado numerosas técnicas para caracterizar los polímeros de impresión molecular. Dicha caracterización implica conocer sus propiedades físico-químicas, la morfología de las partículas y la capacidad de producir un reconocimiento selectivo. A continuación se hace una breve descripción de las distintas técnicas que se pueden aplicar para evaluar cada uno de estos parámetros.

#### *1.3.1. TÉCNICAS EMPLEADAS EN LA CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA*

Las técnicas analíticas más importantes empleadas en la caracterización morfológica de los polímeros de impresión molecular se basan en la observación microscópica de la superficie del polímero y en la medida de la porosidad del mismo.

La superficie del polímero puede evaluarse tanto mediante la microscopía electrónica de barrido (SEM) como mediante la microscopía de fuerza atómica (AFM). La microscopía electrónica de barrido permite obtener una imagen superficial de las partículas de polímero y de la presencia de macroporos superficiales [160,188,189], mientras que la microscopía de fuerza atómica proporciona un perfil tridimensional cuantitativo de la superficie del polímero, que permite diferenciar las fases cristalinas y amorfas [190].

La porosidad del polímero determina la accesibilidad de los analitos a los puntos de unión presentes en el interior de la matriz polimérica, de forma que cuanto mayor sea dicha porosidad, más rápido será el proceso de transferencia de masa y más rápidamente se alcanzará el equilibrio. Aunque existen diversas técnicas para la evaluación de la porosidad, las más empleadas son las basadas en la intrusión/extrusión de mercurio o la adsorción/desorción de nitrógeno, siendo la primera de ellas la más adecuada en el caso de la presencia de macroporos, con un tamaño superior a 50 nm [191].



Estas técnicas se basan en la medida de la cantidad de nitrógeno o mercurio que es capaz de atravesar el material en un período de tiempo determinado, proporcionando información acerca del área superficial específica, el volumen de poro específico, la distribución del tamaño de los poros y su diámetro medio.

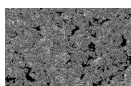
### **1.3.2. TÉCNICAS EMPLEADAS EN LA CARACTERIZACIÓN QUÍMICA**

Debido a la baja solubilidad de los polímeros de impresión molecular, las técnicas químicas más empleadas en la caracterización de este tipo de materiales son aquellas que permiten el análisis en estado sólido.

El análisis elemental del polímero proporciona información acerca del contenido en los distintos elementos (C, O, H, N, S...) presentes en el polímero. Mediante la comparación del resultado con datos teóricos, esta técnica puede utilizarse para determinar, por ejemplo, la cantidad de monómero funcional incorporada a la matriz polimérica, la cantidad de polímero sintetizada sobre una partícula de latex o sílice o la disolución de las partículas de sílica empleadas como “molde” en la preparación del polímero [192,193].

El análisis espectroscópico del polímero, tanto mediante espectroscopia infrarroja (FTIR) como UV-Vis, proporciona información útil acerca del grado de polimerización, los grupos funcionales presentes en el polímero, la formación de enlaces por puentes de hidrógeno [78,190,194] o la relación estequiométrica entre el monómero funcional y el analito plantilla [195].

Por último, el estudio mediante resonancia magnética nuclear de carbono y protón permite evaluar el grado de curación del polímero [78], estableciendo el número de dobles enlaces presentes en el mismo, y, lo que es más importante, la estabilidad del complejo de pre-polimerización [196].



### **1.3.3. CARACTERIZACIÓN DE LA UNIÓN AL ANALITO:** **ISOTERMAS DE ADSORCIÓN**

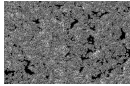
En los polímeros en estado sólido suele ser habitual describir los diferentes mecanismos de adsorción y retención de los compuestos mediante la evaluación de la isoterma de adsorción, la cual permite obtener información sobre la selectividad, la constante de afinidad y la densidad de los sitios de unión.

La evaluación de las isotermas de adsorción se lleva a cabo realizando diferentes ensayos destinados a evaluar la cantidad de analito que se une al polímero al cargar concentraciones crecientes del mismo. Los resultados experimentales obtenidos pueden ajustarse a diversos modelos, que aparecen recogidos en la tabla 6.

***TABLA 6: Modelos de isotermas de adsorción empleados en la caracterización de los puntos de unión de los polímeros de impresión molecular***

<b>Modelo isoterma</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Referencia</b>
Freundlich	$B = a F^m$	[197]
Langmuir	$B = \frac{q K F}{1 + K F}$	[198]
Bi-Langmuir	$B = \frac{q_1 K_1 F}{1 + K_1 F} + \frac{q_2 K_2 F}{1 + K_2 F}$	[199]
Langmuir-Freundlich	$B = \frac{q K F^m}{1 + K F^m}$	[200]
Jovanovic	$B = q (1 - e^{-K F})$	[201]
Bi-Jovanovic	$B = q_1 (1 - e^{-K_1 F}) + q_2 (1 - e^{-K_2 F})$	[201]

En estas fórmulas, **B** representa la cantidad de analito que se une al polímero, **F** es una medida de la cantidad de analito que permanece en la disolución, **q** corresponde a la densidad de puntos de unión presentes en la matriz polimérica, **a** está relacionada con la constante de afinidad media **K** a través de la fórmula  $K = a^{1/m}$  y **m** es el índice de



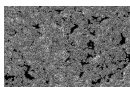
heterogeneidad que toma valores comprendidos entre 0 (material heterogéneo) y 1 (material homogéneo).

De todos estos modelos, el más sencillo es el modelo de Freundlich, útil en la descripción de materiales heterogéneos, donde los procesos de adsorción son generalmente a través de puntos de unión de baja afinidad. Los modelos de Langmuir o Jovanovic, por otro lado, se ajustan bien al comportamiento de materiales homogéneos. En el caso que co-existan puntos de unión de alta y baja afinidad, puede recurrirse al empleo de los modelos de bi-Langmuir o bi-Jovanovic, que en muchas ocasiones son una mejor aproximación que los modelos simples, donde sólo se considera un tipo de puntos de unión.

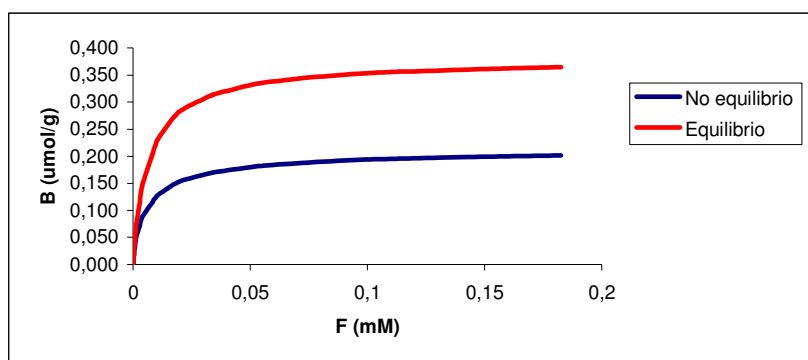
Por último, el modelo de Langmuir-Freundlich es capaz de describir el comportamiento de materiales tanto homogéneos como heterogéneos, siendo una buena aproximación a la descripción del mecanismo de adsorción presente en la mayoría de los polímeros de impresión molecular.

Una forma sencilla de evaluar cuál es la isoterma más adecuada para la descripción de cada mecanismo concreto consiste en la representación de  $\log B$  en función de  $\log F$ . Aquellos datos de adsorción que presenten una relación lineal de ambas magnitudes en todo el intervalo de concentraciones se ajustan preferentemente a una isoterma de Freundlich, mientras que si no presentan una relación lineal lo más probable es que se ajusten al modelo de Langmuir. Para aquellos casos en los que se presente un comportamiento mixto (relación lineal a bajas concentraciones y no lineal a concentraciones elevadas) se ajustan al modelo de Langmuir-Freundlich.

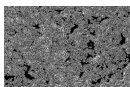
Es importante mencionar que para elegir el modelo apropiado, se debe prestar un especial cuidado a que el sistema se halle efectivamente en equilibrio termodinámico. En caso contrario, los resultados obtenidos pueden estar influidos por otros parámetros suplementarios, tales como la accesibilidad a los puntos de unión [202], que generalmente se traducen en una subestimación de la capacidad real del polímero. En la figura 9 se aprecia el error que se cometería en la medida de la capacidad de un



polímero impreso con propazina si el sistema se estudia en condiciones de no equilibrio. Cuando se le dió tiempo a la propazina para que interaccionara con todos los puntos de unión presentes en la matriz polimérica, se observó un claro aumento de la capacidad obtenida, claramente demostrando que la cinética de transferencia de masa de la propazina a los huecos juega un papel fundamental en el mecanismo de adsorción.



**FIGURA 9:** Comparación entre las isothermas de adsorción medidas en equilibrio ( $t = 30$  minutos) y fuera del equilibrio ( $t = 0$ ) para un polímero impreso semi-covalente sintetizado empleando metacrilato de propazina como monómero



## **1.4. - APLICACIONES**

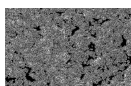
Como se ha mencionado anteriormente, el campo de aplicación de los polímeros de impresión molecular es actualmente muy amplio, siendo las aplicaciones más importantes su empleo como adsorbentes selectivos en procesos de extracción en fase sólida o como fases estacionarias en cromatografía (HPLC) y electrocromatografía capilar. A continuación se resumen algunas de estas aplicaciones.

### **1.4.1. EMPLEO DE MIPs COMO ADSORBENTES SELECTIVOS EN EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA**

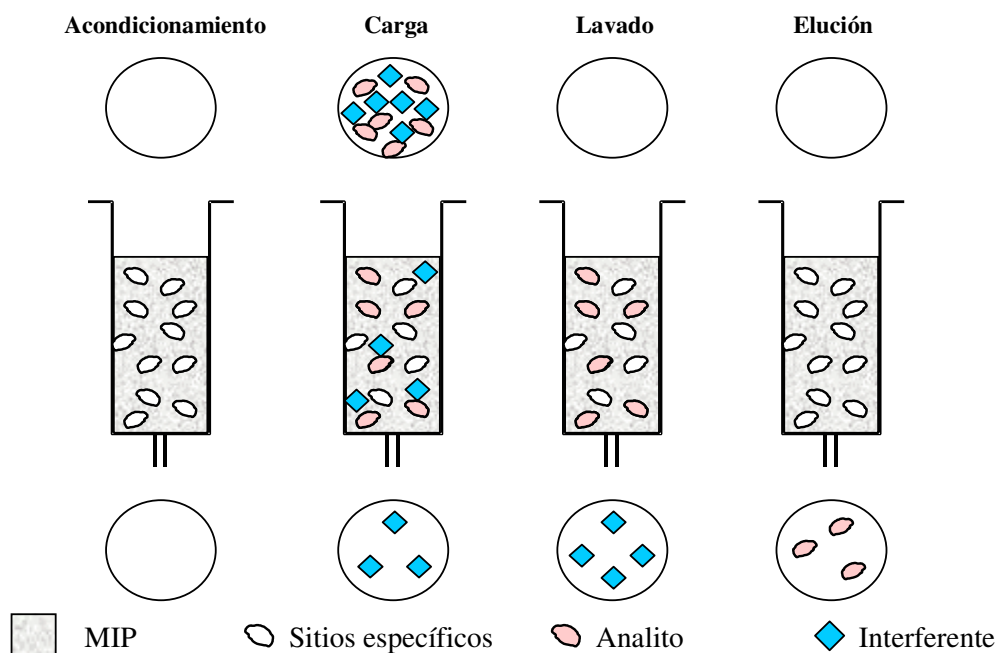
Los polímeros de impresión molecular se emplean muy habitualmente como material selectivo en procesos de extracción en fase sólida para la limpieza selectiva de muestras. Esta aplicación es la que ha adquirido mayor importancia debido a la gran selectividad de los MIPs si se comparan con otros adsorbentes como la sílice modificada (C<sub>18</sub>), el poliestireno-divinilbenceno o las resinas de intercambio iónico. Este hecho hace que la eficiencia de la limpieza de las muestras sea mucho más elevada, similar a la que se obtendría en el caso de emplear inmunosorbentes.

Una vez obtenido el polímero, éste debe triturarse y tamizarse hasta el tamaño de partícula deseado (50-100 µm). Posteriormente, se somete a un proceso de extracción del analito plantilla con el fin de liberar las cavidades formadas. Habitualmente, esta etapa se lleva a cabo por extracción Soxhlet o lavado con disolventes de elevada constante dieléctrica. Por último, se trasvasa una pequeña cantidad (100-200 mg) a un cartucho para realizar las extracciones en discontinuo, y se llevan a cabo las etapas características de un proceso de extracción en fase sólida.

Estas etapas, que aparecen recogidas en la figura 10, incluyen el acondicionamiento previo del polímero con el disolvente en el que se va a cargar la muestra, la carga de la muestra sobre el polímero y fijación selectiva de los analitos en



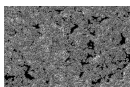
las cavidades del mismo, el lavado de los compuestos interferentes retenidos de manera inespecífica en el polímero y la elución de los analitos con el disolvente adecuado.



**FIGURA 10: Etapas de un proceso de extracción en fase sólida sobre un polímero de impresión molecular**

La elección del disolvente más adecuado para cada una de estas etapas debe hacerse basándose no sólo en la solubilidad de los analitos en los distintos disolventes empleados en cada una de las etapas, sino en el tipo de interacción implicada en la unión analito-polímero y en el porogen empleado durante la polimerización. El disolvente más adecuado para efectuar la carga de la muestra será aquél que favorezca la interacción entre los analitos y el polímero, siendo el porogen una primera aproximación a considerar. Por el contrario, el disolvente empleado en la elución se seleccionará en función de su facilidad para destruir la interacción específica entre los analitos y el MIP.





En la actualidad, se han escrito numerosos artículos [20,21,203-210] en los que se describe el empleo de los polímeros de impresión molecular como adsorbentes selectivos en procesos de extracción en fase sólida. Así, por ejemplo, estos materiales se han aplicado con éxito a la determinación de una gran variedad de analitos (pesticidas, productos farmacéuticos, aminoácidos, metales...) en muestras de muy diversa naturaleza (alimentos, agua, suelos, fluidos biológicos, medicamentos...)

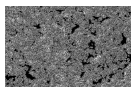
#### **1.4.2. EMPLEO DE MIPs COMO FASES ESTACIONARIAS SELECTIVAS EN TÉCNICAS DE SEPARACIÓN**

##### **a) HPLC**

El empleo de polímeros de impresión molecular como fases estacionarias en HPLC plantea una serie de problemas que han limitado considerablemente su aplicación. Entre estos problemas se encuentran la heterogeneidad de las cavidades generadas durante la síntesis del polímero, la necesidad de disponer de partículas esféricas de polímero con una distribución homogénea de tamaños y la escasa velocidad a la que transcurren los procesos de transferencia de masa hasta las cavidades.

Estos problemas se han solucionado en parte mediante la optimización de las condiciones de síntesis del polímero. Así, por ejemplo, se puede recurrir a un método de síntesis covalente o semi-covalente, ya que de esta forma se consigue una distribución más homogénea de huecos en la matriz polimérica. Los problemas de heterogeneidad en el tamaño de las partículas y transferencia de masa se pueden solucionar mediante la polimerización sobre partículas de sílice o latex, que pueden o no disolverse posteriormente a la síntesis del MIP [148,177].

Una ventaja adicional de utilizar los polímeros como fases estacionarias en HPLC es que se puede llevar a cabo la caracterización de las uniones analito-polímero de una manera rápida y sencilla, para lo que generalmente se utiliza la técnica de cromatografía frontal. Existen numerosos trabajos en los que se describe el empleo y la



caracterización de los polímeros impresos como fases estacionarias en cromatografía [22,211-217].

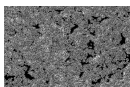
De esta forma, los MIPs se han aplicado con éxito a la separación cromatográfica de numerosos analitos de la matriz. Entre estos analitos se encuentran, por ejemplo, carbohidratos, aminoácidos, péptidos, proteínas, productos farmacéuticos, herbicidas, fungicidas..., si bien existen muy pocos trabajos donde se emplean como fases estacionarias para la separación de familias de compuestos.

### **b) Electrocromatografía capilar (CEC)**

El empleo de los polímeros de impresión molecular como fases estacionarias en electrocromatografía capilar proporciona separaciones altamente eficaces y selectivas para diversos analitos. Además, la miniaturización del sistema permite trabajar con analitos plantilla caros o difíciles de obtener en estado puro, puesto que sólo se necesita una pequeñísima cantidad (nmol) para preparar el polímero. Este hecho es especialmente importante en el caso de los polímeros sintetizados para la separación de enantiómeros.

No obstante, la adaptación de la tecnología de la impresión molecular a la electrocromatografía plantea una serie de inconvenientes que deben subsanarse. El más importante de todos ellos es, sin lugar a dudas, la incompatibilidad existente entre el medio necesario para favorecer la interacción específica analito plantilla-MIP (generalmente un disolvente apolar) y el medio necesario para sustentar el flujo electroosmótico en electrocromatografía capilar (agua o disoluciones salinas acuosas).

La adaptación de la tecnología de impresión molecular a los requisitos de la electrocromatografía capilar requiere optimizar una serie de parámetros, de manera que, manteniendo el flujo electroosmótico necesario para impulsar la fase móvil a través del capilar, no se perjudique la interacción selectiva entre el analito plantilla y los sitios de unión del polímero.



Los distintos parámetros a optimizar se pueden dividir en:

1.- Parámetros relativos al procedimiento de síntesis del polímero:

- a) Naturaleza y concentración de los monómeros
- b) Naturaleza del porogen
- c) Temperatura de polimerización
- d) Tiempo de polimerización

2.- Parámetros relativos a la composición del electrolito:

- a) Modificador orgánico
- b) pH
- c) Fuerza iónica

3.- Otros parámetros:

- a) Potencial del proceso electrocromatográfico
- b) Temperatura de separación

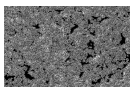
A continuación se expone brevemente cómo afectan cada uno de estos parámetros al reconocimiento del analito plantilla por el polímero.

***Parámetros relativos al procedimiento de síntesis del polímero:***

*Naturaleza y concentración de los monómeros:*

Los monómeros más utilizados para la síntesis de MIPs como fases estacionarias en electrocromatografía capilar son el ácido metacrílico y la 4-vinilpiridina. Por otro lado, los entrecruzantes más utilizados han sido el trimetilpropano trimetacrilato (TRIM) y el etilenglicol dimetacrilato (EDMA).

Schweitz y col. [161] estudiaron la influencia que la relación entre la concentración de la plantilla y diferentes monómeros tenía sobre la separación enantiomérica de racémicos de propranolol y atenolol. Dichos autores concluyeron que el aumento de la relación molar entre monómero y analito plantilla se traduce en una mayor selectividad por el enantiómero empleado como plantilla (s-propranolol) y en



una disminución de la resolución del racémico, debido a la presencia de interacciones inespecíficas y el ensanchamiento de los picos electrocromatográficos. Por otro lado, aún a pesar de que el empleo de EDMA favorece la interacción entre el analito y el polímero, conduce también a un ensanchamiento de los picos que puede dificultar su detección, por lo que muchas veces es necesario recurrir al empleo de TRIM como entrecruzante.

#### *Porogen:*

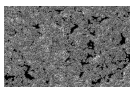
El porogen juega un papel clave en el control de la porosidad de los monolitos. En este sentido, la síntesis de monolitos macroporosos se basa en el empleo de una mezcla de disolventes. En este sentido, se añade a la mezcla de polimerización un disolvente, generalmente iso-octano, que induzca la etapa de terminación de la polimerización, lo que conduce a la formación de macroporos en la estructura del polímero. Como se ha mencionado anteriormente, pueden utilizarse contenidos de isooctano de hasta un 20% para incrementar la porosidad del polímero sin pérdidas del reconocimiento [126].

#### *Temperatura de polimerización:*

En general, se ha demostrado que el empleo de una menor temperatura durante la polimerización conduce a una mayor resolución en la separación de enantiómeros y un menor tiempo en el análisis mediante electrocromatografía capilar [160,218]. Este hecho se debe a la estabilización del complejo de prepolimerización a bajas temperaturas, lo que conduce a una mejor definición de las cavidades presentes en la matriz polimérica.

#### *Tiempo de polimerización:*

El tiempo de polimerización es una variable crítica en la síntesis de MIPs como fases estacionarias. Por un lado, debe ser suficiente para permitir la formación de una cantidad adecuada de polímero en el interior del capilar. Sin embargo, cuando el tiempo



es excesivamente largo, la porosidad del polímero se ve afectada, dando lugar a problemas en la transferencia de masa desde la disolución hasta las cavidades presentes en la matriz polimérica. Como consecuencia, los picos obtenidos se ensanchan hasta el punto de perder totalmente la resolución cromatográfica.

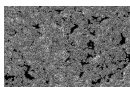
### ***Parámetros relativos a la composición del electrolito:***

#### ***Modificador orgánico:***

Como se ha mencionado anteriormente, la interacción analito-polímero se basa en la formación de puentes de hidrógeno. Esta interacción se ve desfavorecida en los medios acuosos necesarios para la separación electroforética, y es por ello que se añade un modificador orgánico que potencie la interacción entre el analito plantilla y el polímero. El disolvente orgánico más utilizado ha sido el acetonitrilo, cuyo contenido oscila entre un 50 y un 95%, independientemente del formato utilizado en el relleno del capilar. Generalmente, la optimización del contenido de acetonitrilo se lleva a cabo en función de la interacción selectiva con el polímero, la resolución de los picos y el tiempo de análisis. Habitualmente, el porcentaje de acetonitrilo empleado oscila entre un 70 y un 90% [160,182,219].

#### ***pH:***

El pH del electrolito es un factor importante a tener en cuenta, ya que afecta al estado de protonación tanto de la matriz polimérica como de los analitos, pudiendo por lo tanto alterar a la interacción de los analitos con el polímero si los grupos funcionales que intervienen en la misma se ven modificados, afectando por lo tanto al reconocimiento selectivo.



#### *Fuerza iónica:*

La fuerza iónica parece haber sido la variable menos estudiada hasta el momento. No obstante, parece claro que una mayor fuerza iónica en el electrolito aumenta la resolución de los picos electrocromatográficos.

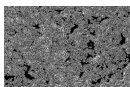
#### *Otros parámetros:*

##### *Potencial:*

La evaluación del efecto del potencial aplicado durante el proceso electrocromatográfico sobre la retención del analito plantilla ha demostrado que la resolución de los picos disminuye drásticamente al aumentar el valor del potencial. Es necesario evaluar que al potencial de trabajo empleado no existe calentamiento del capilar por efecto Joule. Dicho calentamiento puede considerarse despreciable siempre que exista una relación lineal entre el potencial aplicado y la intensidad de corriente.

##### *Temperatura:*

Numerosos estudios han demostrado que, por lo general, el aumento de la temperatura mejora la resolución de los picos electrocromatográficos. Esto se debe al estrechamiento de los picos producido por la mejora en los procesos de transferencia de masa a elevadas temperaturas [161]. No obstante, y debido al aumento en el flujo electroosmótico cuando se aumenta la temperatura, la separación relativa entre los picos disminuye considerablemente, lo que hace que sea necesario llegar a una situación de compromiso [220].



### ***Aplicaciones***

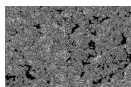
La inmensa mayoría de las aplicaciones de los polímeros de impresión molecular como fases estacionarias en electrocromatografía capilar se han centrado en la separación de racémicos. Esto es debido fundamentalmente a la posibilidad de demostrar sin lugar a dudas la existencia de huecos de unión específicos para el enantiómero empleado como analito plantilla, ya que tanto la movilidad electroforética como las interacciones inespecíficas con la matriz polimérica deberían ser idénticas para ambos enantiómeros. Además, el análisis de enantiómeros está motivado por la demostración de que la actividad biológica, el metabolismo y la toxicidad de muchos compuestos quirales dependen de su configuración [221-223].

En la actualidad, se han escrito numerosos artículos de revisión acerca del empleo de polímeros de impresión molecular como fases estacionarias en sistemas de electrocromatografía capilar. Así, por ejemplo, estos sistemas se han aplicado a la determinación de aminoácidos, anestésicos, nucleótidos o agentes  $\beta$ -bloqueantes [23,224-230].

#### **1.4.3. EMPLEO DE MIPs EN EL DESARROLLO DE SENSORES**

En los últimos años se han desarrollado numerosos sensores basados en el empleo de polímeros de impresión molecular para la detección selectiva de los analitos en muestras relativamente complejas y condiciones extremas (altas temperaturas o medios químicos agresivos). La elevada estabilidad de este tipo de materiales es una excelente alternativa al empleo de biomoléculas, generalmente utilizadas como medio de reconocimiento selectivo en la fabricación de sensores.

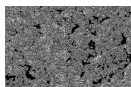
De esta forma, se han desarrollado sensores ópticos [231-237], electroquímicos [238-241] o piezoeléctricos [240,242] basados en el empleo de polímeros de impresión molecular para la determinación de pesticidas, productos farmacéuticos, amino ácidos, glucosa, etc [243,244].



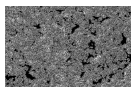
### 1.5. - BIBLIOGRAFÍA

1. Y. Kubo, Y. Ishii, *J. Nanosci. Nanotech.*, **2006**, 6, 1489
2. P. Shahgaldian, U. Pieleles, *Sensors*, **2006**, 6, 593
3. M.J.W. Ludden, D.N. Reinhoudt, J. Huskens, *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, 35, 1122
4. F. Anco, T. Chang, S.J. Cantrill, Khan, S.I., Stoddart, J.F., *Chem.-A Eur. J.*, **2005**, 11, 4655
5. J.D. Marty, M. Mauzac, *Adv. Polym. Sci.*, **2005**, 172, 1
6. D.J. Cram, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1988**, 27, 1009
7. P. Pedersen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1988**, 27, 1021
8. J.M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1988**, 27, 89
9. G. Wenz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1994**, 33, 803
10. S.A. Piletsky, A.P.F. Turner, *Electroanal.*, **2002**, 14, 317S
11. M.V. Polyakov, *Zhur. Fiz. Khim.*, **1931**, 2, 799
12. L. Pauling, *J. Am. Chem. Soc.*, **1940**, 62, 2643
13. F.H. Dickey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1949**, 35, 227
14. F.H. Dickey, *J. Phys. Chem.*, **1955**, 59, 695
15. S.A. Bernhard, *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, 74, 4946
16. G. Wulff, A. Sarhan, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1972**, 11, 341
17. T. Takagishi, I.M. Klotz, *Biopolymers*, **1972**, 11, 483
18. L.I. Andersson, B. Sellergren, K. Mosbach, *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 25, 5211
19. Ch. He, Y. Long, J. Pan, K. Li, F. Liu, *J. Biomed. Biophys. Methods*, **2007**, 70(2), 133
20. V. Pichon, K. Haupt, *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, **2006**, 29, 989
21. E. Caro, R.M. Marcé, F. Borrull, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, *TRAC*, **2006**, 25, 143
22. E. Hogendoorn, P. van Zoonen, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 892, 435

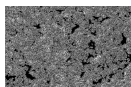




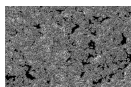
23. E. Turiel, A. Martin-Esteban, *J. Sep. Sci.*, **2005**, 28, 719
24. A.L. Hillberg, K.R. Brain, C.J. Allender, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2005**, 57, 1875
25. M. Tada, Y. Iwasawa, *Ann. Rev. Mat. Res.*, **2005**, 35, 397
26. C. Alexander, L. Davidson, W. Hayes, *Tetrahedron*, **2003**, 59, 2025
27. A. Visnjevski, R. Schomaker, E. Yilmaz, O. Bruggemann, *Catal. Commun.*, **2005**, 6, 601
28. H. Hiratani, Y. Mizutani, *Macromol. Bioscience*, **2005**, 5, 728
29. A.G. Mayes, M.J. Whitcombe, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2005**, 57, 1742
30. G. Wulff, R. Vesper, *J. Chromatogr.*, **1978**, 167, 171
31. G. Wulff, M. Minarik, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **1986**, 9, 607
32. G. Wulff, M. Minarik, *J. Liq. Chromatogr.*, **1990**, 13, 2987
33. S.H. Gao, W. Wang, B.H. Wang, *Bioorg. Chem.*, **2001**, 29, 308
34. S.A. Piletsky, K. Piletska, E.V. Piletskaya, K. Yano, A. Kugimiya, A.V. Elgersma, R. Levi, U. Kahlow, T. Takeuchi, I. Karube, T.I. Panasyuk, A.V. Elskaya, *Anal. Lett.*, **1996**, 29, 157
35. W. Wang, S.H. Gao, B.H. Wang, *Org. Lett.*, **1999**, 1, 1209
36. N. Sneschkoff, K. Crabb, J.J. BelBruno, *J. Appl. Polym. Sci.*, **2002**, 86, 3611
37. V.P. Joshi, R.N. Karmalkar, M.G. Kulkarni, R.A. Mashelkar, *Ind. Chem. Engn. Res.*, **1999**, 38, 4417
38. E. Caro, N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, *J. Chromatogr. A*, **2002**, 963, 169
39. S.E. Byström, A. Börje, B.A. Kermack, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 2081
40. B. Sellergren, L.I. Andersson, *J. Org. Chem.*, **1990**, 55, 3381
41. M.J. Whitcombe, M.E. Rodríguez, P. Villar, E.N. Vulfsson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 7105
42. H.C. Wang, W.C. Lee, *J. Chromatogr. A*, **2002**, 962, 69
43. C.J. Percival, S. Stanley, A. Braithwaite, M.I. Newton, G. McHale, *Analyst*, **2002**, 127, 1024



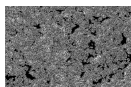
44. M. Petcu, J. Cooney, C. Cook, D. Lauren, P. Schaare, P. Holland, *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 435, 49
45. V.P. Joshi, S.K. Karode, M.G. Kukarni, R.A. Mashelkar, *Chem. Engn. Sci.*, **1998**, 53, 2271
46. C. Alexander, H.S. Andersson, L.I. Andersson, R.J. Ansell, N. Kirsch, I.A. Nicholls, J. O'Mahony, M.J. Whitcombe, *J. Mol. Recogn.*, **2006**, 19, 106
47. R. Arshady, K. Mosbach, *Makromol. Chem.*, **1981**, 182, 687
48. C. Cacho, E. Turiel, A. Martín-Esteban, C. Pérez-Conde, C. Cámara, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2003**, 376, 491
49. C. Cacho, E. Turiel, A. Martín-Esteban, C. Pérez-Conde, C. Cámara, *J. Chromatogr. B*, **2004**, 802, 347
50. B. Sellergren, *Molecularly Imprinted Polymers: Man-Made Mimics of Antibodies and their Application in Analytical Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, 2001, Capítulo 5
51. D. Batra, K.J. Shea, *Current Opinions in Chemical Biology*, **2003**, 7, 434
52. F. Lanza, A.J. Hall, B. Sellergren, A. Bereczki, G. Horvai, S. Bayouth, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, *Anal Chim Acta*, **2001**, 435, 91
53. T. Takeuchi, D. Fukuma, J. Matsui, *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 285
54. F. Lanza, B. Sellergren, *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 2092
55. J. Cederfur, Y.X. Pei, Z.H. Meng, M. Kempe, *J. Com. Chem.*, **2003**, 5, 67
56. M.P. Dawies, V.D. Biasi, D. Perrett, *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 504, 7
57. F. Navarro-Villoslada, B. SanVicente, M.C. Moreno-Bondi, *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 504, 149
58. S.A. Piletsky, K. Karim, E.V. Piletskaya, C.J. Day, K.W. Freebaim, C. Legee, A.P.F. Turner, *Analyst*, **2001**, 126, 1826
59. S.I. Chianella, M. Lotierzo, S.A. Piletsky, I.E. Tothill, B.N. Chen, K. Karim, A.P.F. Turner, *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 1288
60. L.Q. Wu, B.W. Sun, Y.Z. Li, W.B. Chang, *Analyst*, **2003**, 128, 944
61. B. Sellergren, *Trends in Anal. Chem.*, **1999**, 18, 164
62. O. Ramström, L.I. Andersson, K. Mosbach, *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 7562
63. Z.H. Meng, J.F. Wang, L.M. Zhou, Q.H. Wang, D.Q. Zhu, *Anal. Sci.*, **1995**, 15, 141



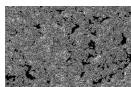
64. L. Schweitz, L.I. Andersson, S. Nilsson, *Analyst*, **2002**, 127, 22
65. G. Wulff, S. Schauhoff, *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 395
66. A. Kugimiya, J. Matsui, T. Takeuchi, K. Yano, H. Muruguma, A.V. Elgersma, I. Karube, *Anal. Letters*, **1995**, 28, 2317
67. A. Kugimiya, J. Matsui, H. Abe, M. Aburatani, T. Takeuchi, *Anal. Chim. Acta*, **1998**, 365, 75
68. N. Sallacan, M. Zayats, T. Bourenko, A.B. Kharitonov, I. Willner, *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 702
69. G. Wulff, G. Wolf, *Chem. Ber.*, **1986**, 119, 1876
70. J. Damen, D.C. Neckers, *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 21, 1913
71. J. Damen, D.C. Neckers, *J. Org. Chem.*, **1980**, 45, 1382
72. J. Damen, D.C. Neckers, *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 3265
73. K.J. Shea, E.A. Thompson, *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 4253
74. K.J. Shea, E.A. Thompson, S.D. Pandey, *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 3149
75. G. Wulff, J. Vietmeier, *Makromol. Chem.*, **1989**, 190, 1727
76. G. Wulff, W. Best, A. Alekah, *React. Polym.*, **1984**, 2, 167
77. K.J. Shea, T.K. Dougherty, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 1091
78. K.J. Shea, D.Y. Sasaki, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 3442
79. K.J. Shea, D.Y. Sasaki, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 4109
80. G. Wulff, R. Vesper, R. Grobe-Einsler, A. Sarhan, *Makromol. Chem.*, **1977**, 178, 2799
81. G. Wulff, *Pure Appl. Chem.*, **1982**, 54, 2093
82. C. Alexander, C.R. Smith, M.J. Whitcombe, E.N. Vulfson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 6640
83. C. Yu, K. Mosbach, *J. Mol. Recognit.*, **1998**, 11, 69
84. B. Sellergren, M. Lepistö, K. Mosbach, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 5853
85. O. Ramström, I.A. Nicholls, K. Mosbach, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1994**, 5, 649
86. G. Vlatakis, L.I. Andersson, R. Müller, K. Mosbach, *Nature*, **1993**, 361, 645



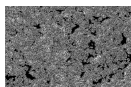
87. L.I. Andersson, *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 111
88. L.I. Andersson, R. Müller, G. Vlatakis, K. Mosbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, 92, 4788
89. A.G. Mayes, L.I. Andersson, K. Mosbach, *Anal. Biochem.*, **1994**, 222, 483
90. B. Sellergren, B. Ekberg, K. Mosbach, *J. Chromatogr.*, **1985**, 347, 1
91. L. Fischer, R. Müller, B. Ekberg, K. Mosbach, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 9358
92. R. Suedee, C. Sonkgram, A. Petmoreekul, S. Sangkunakup, S. Sankasa, N. Kongyarit, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1999**, 19, 519
93. J. Matsui, O. Doblhoff-Dier, T. Takeuchi, *Anal. Chim. Acta*, **1997**, 343, 1
94. J. Matsui, T. Takeuchi, *Anal. Commun.*, **1997**, 34, 199
95. J. Matsui, I.A. Nicholls, T. Takeuchi, *Anal. Chim. Acta*, **1998**, 365, 89
96. S.A. Piletsky, H. Matuschewski, U. Schedler, A. Wilpert, E.V. Piletskaya, T.A. Thiele, M. Ulbricht, *Macromolecules*, **2000**, 33, 3092
97. A. Kugimiya, Y. Kuwada, T. Takeuchi, *J. Chromatogr. A*, **2001**, 938, 131
98. M. Kempe, K. Mosbach, *J. Chromatogr. A*, **1994**, 664, 276
99. M. Kempe, L. Fischer, K. Mosbach, *J. Mol. Recognit.*, **1993**, 6, 25
100. S.A. Piletsky, E.V. Piletskaya, A.V. Elgersma, K. Yano, I. Karube, Y.P. Parhometz, A.V. Elskaya, *Biosens. Bioelectron.*, **1995**, 10, 959
101. R.L. Simon, D.A. Spivak, *J. Chromatogr. B*, **2004**, 804, 203
102. J.Y. Ju, C.S. Shin, M.J. Whitcombe, E.N. Vulfson, *Biotechnol. Bioeng.*, **1999**, 64, 232
103. J. Mathew, O. Buchardt, *Bioconjug. Chem.*, **1995**, 6, 524
104. K. Tanabe, T. Takeuchi, K. Matsui, K. Ikebukuro, K. Yano, I. Karube, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1995**, 2303
105. C. Yu, O. Ramström, K. Mosbach, *Anal. Lett.*, **1997**, 30, 2123
106. T. Pap, G. Horvai, *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1034, 99
107. N. Hidal, V. Kochkodan, L. Al-Khatib, G. Busca, *Surf. Interface Anal.*, **2002**, 33, 672



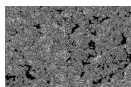
108. S.A. Piletsky, E.V. Piletskaya, K. Karim, K.W. Freebairn, C.H. Legge, A.P.F. Turner, *Macromolecules*, **2002**, 35, 7499
109. K. Sreenivasan, *Polym. Int.*, **1997**, 42, 169
110. M. Sibrián-Vázquez, D.A. Spivak, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 7827
111. H. Sambe, K. Hoshina, R. Moaddel, I.W. Wainer, J. Haginaka, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1134, 88
112. A.H. Wu, M.J. Syu, *Biosens. Bioelectron.*, **2006**, 21, 2345
113. R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez Gonzalo, E. Herrero Hernández, *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 559, 186
114. E. Turiel, J.L. Tadeo, P.A.G. Cormack, A. Martín-Esteban, *Analyst*, **2005**, 130, 1601
115. S.Z. Zhan, Q. Dai, C.W. Yuan, Z.H. Lu, L. Haeussling, *Anal. Lett.*, **1999**, 32, 677
116. T.A. Sergeyeva, S.A. Piletsky, A.A. Brovko, E.A. Slinchenko, L.M. Sergeeva, A.V. Elskaya, *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 392, 105
117. G. Wulff, J. Vietmeier, H.G. Poll, *Makromol. Chem.*, **1987**, 188, 731
118. Q.J. Zhu, J. Tang, J. Dai, X.H. Gu, S.W. Chen, *J. Appl. Polym. Sci.*, **2007**, 104, 1551
119. F. Navarro-Villoslada, J.L. Urraca, M.C. Moreno-Bondi, G. Orellana, *Sens. Actuators B*, **2007**, 121, 67
120. X.C. Dong, H. Sun, X.Y. Lu, H.B. Wang, S.X. Liu, N. Wang, *Analyst*, **2002**, 127, 1427
121. M. Kempe, *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 1948
122. D. Tong, C. Hetenyi, Z. Bikadi, J.P. Gao, S. Hjertén, *Chromatographia*, **2001**, 54, 7
123. K. Ohkubo, K. Sawakuma, T. Sagawa, *Polymer*, **2001**, 42, 2263
124. S.A. Piletsky, H.S. Andersson, I.A. Nicholls, *J. Mol. Recognit.*, **1998**, 11, 94
125. H. Hiratani, C. Alvarez-Lorenzo, J. Chuang, O. Guney, A.Y. Grosberg, T. Tanaka, *Langmuir*, **2001**, 17, 4431
126. Z.S. Liu, Y.L. Xu, C. Yan, R.Y. Gao, *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1087, 20
127. S.A. Piletsky, I. Mijangos, A. Guerreiro, E.V. Piletskaya, I. Chianella, K. Karim, A.P.F. Turner, *Macromolecules*, **2005**, 38, 1410



128. N. Pérez-Moral, A.G. Mayes, *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 504, 15
129. S.Q. Song, A.B. Wu, X.Z. Shi, R.X. Li, Z.X. Lin, D.B. Zhang, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 390, 2141
130. L. Guzzella, F. Pozzoni, C. Baggiani, *Water Science Technol.*, **2008**, 57, 139
131. M. Shamsipur, J. Fasihi, A. Khanchi, R. Hassani, K. Alizadeh, H. Shamsipur, *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 599, 294
132. E.C. Figueiredo, C.R.T. Tarley, L.T. Kubota, S. Rath, M.A.Z. Arruda, *Microchem. J.*, **2007**, 85, 290
133. C.R.T. Tarley, M.G. Segatelli, L.T. Kubota, *Talanta*, **2006**, 69, 259
134. F. Schnerider, S. Piletsky, E. Piletska, A. Guerreiro, M. Ulbricht, *J. Appl. Pol. Sci.*, **2005**, 98, 362
135. C.R.T. Tarley, L.T. Kubota, *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 548, 11
136. C.Y. Hung, H.H. Huang, C.C. Hwang, *Eclet. Quim. [online]*, **2005**, 30, 4
137. L. Ye, P.A.G. Cormack, K. Mosbach, *Annal. Commun.*, **1999**, 36, 35
138. P. Li, F. Rong, X. Zhu, Y. Xie, C. Yuan, *Polym. Int.*, **2003**, 52, 1799
139. L. Ye, P.A.G. Cormack, K. Mosbach, *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 435, 187
140. W. Shuting, B. Mizaikoff, *Biosens. & Bioelectron.*, **2007**, 23, 201
141. C. Baggiani, P. Baravalle, L. Anfossi, C. Tozzi, *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 542, 125
142. J.F. Wang, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, E. Khoshdel, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2003**, 42, 5336
143. S. Daniel, P. Prabhakara, T. Prasada Rao, *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 536, 197
144. S. Hong, R. Albu, C. Labbe, T. Lasuye, B. Stasik, G. Riess, *Polym. Internatl.*, **2006**, 55, 1426
145. C. Guerrero-Sánchez, T. Erdmenger, P. Sereda, D. Wouters, U.S. Schubert, *Chemistry-A Eur. J.*, **2006**, 12, 9036
146. D. Maggioris, A. Goulas, A.H. Alexopoulos, E.G. Chatzi, C. Kiparissides, *Chem. Engn. Sci.*, **2000**, 55, 4611
147. K. Hosoya, K. Yoshizako, N. Tanaka, K. Kimata, T. Araki, J. Haginaka, *Chem. Lett.*, **1994**, 8, 1437

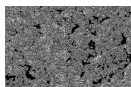


148. K. Tsukagoshi, K.Y. Yu, M. Maeda, M. Takagi, T. Miyajima, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1995**, 68, 3095
149. F. Gutiérrez Tamayo, M. Titirici, A. Martín-Esteban, B. Sellergren, *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 542, 38
150. M. Shamsipur, J. Fasihi, K. Ashtari, *Anal. Chem.*, **2007**, 79, 7116
151. H. Tokuyama, S. Naohara, M. Fujioka, S. Sakohara, *React. & Funct. Pol.*, **2008**, 68, 182
152. T.Y. Guo, Y.Q. Xia, G.J. Hao, B.H. Zhang, G.Q. Fu, Z. Yuan, B.L. He, J.F. Kennedy, *Carbohydrate Polymers*, **2005**, 62, 214
153. A. Bossi, S.A. Piletsky, E.V. Piletska, P.G. Righetti, A.P.F. Turner, *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 5281
154. M. Shamsipur, J. Fasihi, K. Ashtari, *Anal. Chem.*, **2007**, 79, 7116
155. M.M. Titirici, B. Sellergren, *Chem. Mater.*, **2006**, 18, 1773
156. C. Sulitzky, B. Rückert, A.J. Hall, F. Lanza, K. Unger, B. Sellergren, *Macromolecules*, **2002**, 35, 79
157. C. Baggiani, P. Baravalle, G. Giraudi, C. Tozzi, *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1141, 158
158. T.D. Maloney, L.A. Colon, *J. Sep. Sci.*, **2002**, 25, 215
159. J.M. Lin, T. Nakagama, K. Uchiyama, T. Hobo, *Chromatographia*, **1996**, 43, 585
160. L. Schweitz, L.I. Andersson, S. Nilsson, *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 1179
161. L. Schweitz, L.I. Andersson, S. Nilsson, *J. Chromatogr. A*, **1997**, 792, 401
162. Z. Liu, H. Zou, J.Y. Ni, Y. Zhang, *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 378, 73
163. X. Huang, J. Zhang, C. Horvath, *J. Chromatogr. A*, **1999**, 858, 91
164. Z.J. Tan, V.T. Remchko, *J. Microcol. Sep.*, **1998**, 10, 99
165. J.D. Hayes, A. Malik, *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 987
166. L. Schweitz, *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 1192
167. L. Schweitz, P. Spéjel, S. Nilsson, *Analyst*, **2000**, 125, 1899
168. E. Turiel, A. Martín-Esteban, P. Fernández, C. Pérez-Conde, C. Cámara, *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 5133

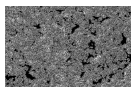


169. F. Gutiérrez Tamayo, J.L. Casillas, A. Martín-Esteban, *Anal. Chim. Acta*, **2003**, 482, 165
170. P. Spégel, S. Nilsson, *Am. Lab.*, **2002**, 34, 29
171. P. Spégel, L. Schweitz, S. Nilsson, *Electrophoresis*, **2001**, 22, 3833
172. Th. de Boer, R. Mol, R.A. de Zeeuw, G.J. de Jong, D.C. Sherrington, P.A.G. Cormack, K. Ensing, *Electrophoresis*, **2002**, 23, 1296
173. P. Spégel, L. Schweitz, S. Nilsson, *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 6608
174. D.C. Sherrington, P. Hodge, *Synthesis and separations of functional polymers*, Wiley, Chichester, 1988
175. A.G. Mayes, K. Mosbach, *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 3769
176. K. Hosoya, K. Yoshizako, Y. Shirasu, K. Kimata, T. Araki, N. Tanaka, J. Haginaka, *J. Chromatogr. A*, **1996**, 728, 139
177. E. Yilmaz, O. Ranström, P. Möller, D. Sánchez, K. Mosbach, *J. Mater. Science*, **2002**, 12, 1577
178. J. Matsui, T. Kato, T. Takeuchi, M. Suzuki, K. Yokohama, E. Tamiya, I. Karube, *Anal. Chem.* **65** (1993) 2223
179. X. Huang, H. Zou, X. Chen, Q. Luo, L. Kong, *J. Chromatogr. A*, **2003**, 984, 273
180. L. Schweitz, L.I. Andersson, S. Nilsson, *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 435, 43
181. J.M. Lin, T. Nakagama, X.Z. Wu, K. Uchiyama, T. Hobo, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1997**, 357, 130
182. J.M. Lin, T. Nakagama, K. Uchiyama, T. Hobo, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1997**, 15, 1351
183. W. Yan, R. Gao, Z. Zhang, Q. Wang, C.V. Jiang, C. Yan, *J. Sep. Sci.*, **2003**, 26, 555
184. Z.S. Liu, Y.L. Xu, W. Hefang, C. Yan, R. Gao, *Anal. Sci.*, **2004**, 20, 673
185. O. Brüggemann, R. Freitag, M.J. Whitcombe, E.N. Vulfsson, *J. Chromatogr. A*, **1997**, 78, 43
186. Z.J. Tan, V. Remchko, *Electrophoresis*, **1998**, 19, 2055
187. Y.Ch. Huang, Ch. Lin, Ch. Ying-Liu, *Electrophoresis*, **2004**, 25, 554
188. J. Yin, C. Yang, Y. Chen, *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1090, 68

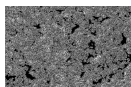




189. C. Paniagua-González, P. Fernández-Hernando, J.S. Durand-Alegría, *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 557, 179
190. M.A. Gore, R.N. Karmalkar, M.G. Kulkarni, *J. Chromatogr. B*, **2004**, 804, 211
191. J.G. Karlsson, *Analyst*, **2004**, 129, 456
192. M. Andaç, R. Say, A. Denizli, *J. Chromatogr. B*, **2004**, 811, 119
193. M.L. Yang, Y.Z. Li, *J. Mol. Recognit.*, **2005**, 18, 103
194. H.Y. Wang, S.L. Xia, H. Sun, Y.K. Liu, S.K. Cao, T. Kobayashi, *J. Chromatogr. B*, **2004**, 804, 127
195. H.S. Andersson, I.A. Nicholls, *Bioorg. Chem.*, **1997**, 25, 203
196. J. O'Mahony, A. Molinelli, K. Nolan, M.R. Smyth, B. Mizaikoff, *Biosens. Bioelectron.*, **2006**, 21, 1383
197. R.J. Umpleby II, S.C. Baxter, M. Bode, J.K. Berch Jr., R.N. Shah, K.D. Shimizu, *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 435, 35
198. M. Lehmann, M. Dettling, H. Brunner, G.E.M. Tovar, *J. Chromatogr. B*, **2004**, 808, 43
199. H. Kim, K. Kaczmarek, G. Guiochon, *Chem. Engn. Sci.*, **2005**, 60, 5425
200. R.J. Umpleby, I. Sarah, C. Baxter, Y. Chen, N. Shah, K.D. Shimizu, *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 4584
201. I. Quiñones, B. Stanley, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, **1999**, 849, 45
202. C. Baggiani, G. Giraudi, C. Giovannoli, C. Tozzi, L. Anfossi, *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 504, 43
203. J. Haginaka, *Trends in Anal. Chem.*, **2005**, 24, 407
204. K. Pyrzynska, *Chemia Analytyczna*, **2003**, 48, 781
205. M.C. Hennion, V. Pichon, *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1000, 29
206. L.I. Andersson, *Bioseparation*, **2001**, 10, 353
207. A. Martín-Esteban, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **2001**, 370, 795
208. F. Lanza, B. Sellergren, *Chromatographia*, **2001**, 53, 599
209. L.I. Andersson, *J. Chromatogr. B*, **2000**, 739, 163
210. M.C. Hennion, *J. Chromatogr. A*, **1999**, 856, 3



211. H.F. Zou, X.D. Huang, M.L. Ye, Q.Z. Luo, *J. Chromatogr. A*, **2002**, 954, 5
212. B. Sellergren, in *A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*, G. Subramanian (Ed.) Wiley-VCH, Weinheim (1994) 69
213. A.J. Hall, P. Manesiotis, J.T. Mossing, B. Sellergren in *Molecularly Imprinted Materials: Sensors and Other Devices*, MRS Symposium Proceedings Vol 723, K.J. Shea, M. Yan, M.J. Roberts, P.S. Cremer, R.M. Crooks, M.J. Sailor (Eds.) Materials Research Society (2002) 11
214. F.H. Arnold, S. Striegler, V. Sundaresan, in *Molecular and Ionic Recognition with Imprinted Polymers*, ACS Symposium Series, Vol 703, R.A. Bartsch, M. Maeda (Eds.), The American Chemical Society (1998), Washington DC 109
215. K. Hosoya, N. Tanaka in *Molecular and Ionic Recognition with Imprinted Polymers*, ACS Symposium Series, Vol 703, R.A. Bartsch, M. Maeda (Eds.), The American Chemical Society (1998), Washington DC, 143
216. M. Kempe in *Encyclopedia of Separation Science*, I.D. Wilson, T.R. Adlard, C.F. Poole, M. Cook (Eds.), Elsevier Ltd., Oxford (2000) 2387
217. B. Sellergren in *Chiral Separation Techniques: A Practical Approach*, G. Subramanina (Ed.), Wiley-VCH, Weinheim (2001) 151
218. J.M. Lin, T. Nakagama, K. Uchiyama, T. Hobo, *Biomed. Chromatogr.*, **1997**, 11, 298
219. G. Chirica, V.T. Remchko, *Electrophoresis*, **1999**, 20, 50
220. J.H. Knox, I.H. Grant, *Chromatographia*, **1991**, 32, 317
221. D. Wistuba, V. Schurig, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 875, 255
222. G. Gubitz, M.G. Schmid, *Electrophoresis*, **2000**, 21, 4112
223. D. Wistuba, V. Schurig, *Electrophoresis*, **2000**, 21, 4136
224. Z.S. Liu, C. Zheng, C. Yan, R.Y. Ga, *Electrophoresis*, **2007**, 28, 127
225. F. Qin, C.H. Xie, Z.Y. Yu, L. Kong, M.L. Ye, H.F. Zou, *J. Sep. Sci.*, **2006**, 29, 1332
226. C. Baggiani, L. Anfossi, C. Giovannoli, *Curr. Pharm. Anal.*, **2006**, 2, 219
227. G. Gubitz, M.G. Schmid, *Mol. Biotechnol.*, **2006**, 32, 159
228. C. Nilsson, S. Nilsson, *Electrophoresis*, **2006**, 27, 76
229. H.Y. Liu, K.H. Row, G.L. Yan, *Chromatographia*, **2005**, 61, 429
230. C.Y. Liu, C.C. Lin, *Electrophoresis*, **2004**, 25, 3997



231. C.J. Stephenson, K.D. Shimizu, *Polym. Intnatl.*, **2007**, 56, 482
232. D. Altschuh, S. Oncul, A.P. Demchenko, *J. Mol. Recognit.*, **2006**, 19, 459
233. O.Y.F. Henry, D.C. Cullen, S.A. Piletsky, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2005**, 382, 947
234. G. Gauglitz, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2005**, 381, 141
235. D.J. Monk, D.R. Walt, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2004**, 379, 831
236. M.D. Marazuela, M.C. Moreno-Bondi, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2002**, 372, 664
237. S. Al-Kindy, R. Badía, J.L. Suárez-Rodríguez, M.E. Díaz-García, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **2000**, 30, 291
238. A. Warsinke, B. Nagel, *Anal. Lett.*, **2006**, 39, 2507
239. E. Bakker, Y. Qin, *Anal. Chem.*, **2006**, 78, 3965
240. M. Trojanowicz, M. Wcislo, *Anal. Lett.*, **2005**, 38, 523
241. S.A. Piletsky, A.P.F. Turner, *Electroanal.*, **2002**, 14, 317
242. K.A. Marx, *Biomacromol.*, **2003**, 4, 1099
243. L. Wuke, L. Songjun, *Adv. Polym. Sci.*, **2007**, 206, 191
244. C.J. Stephenson, K.D. Shimizu, *Polym. Int.*, **2007**, 56, 482

## *2. PLAGUICIDAS*



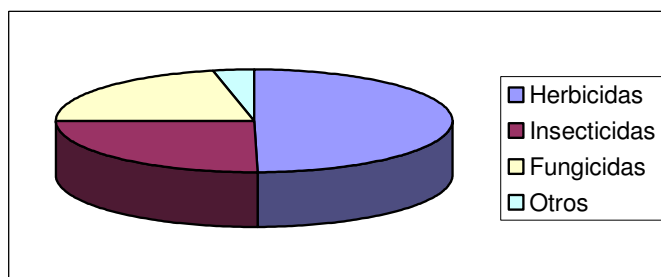


## 2.1. CONCEPTOS GENERALES

La explosión demográfica que ha tenido lugar en las últimas décadas ha desencadenado la necesidad de buscar sistemas más eficaces para la producción de alimentos, a fin de satisfacer la creciente demanda de los mismos. Es por ello que tanto la agricultura como la ganadería deben hacer frente a la necesidad de obtener un mayor número de alimentos en un terreno cada vez más pequeño y con menos mano de obra.

Una de las consecuencias directas de esta necesidad fue la introducción en el mercado de los plaguicidas, también conocidos como pesticidas. Los plaguicidas son todos aquellos compuestos que se aplican tanto sobre el terreno como sobre el propio cultivo con el fin de controlar, destruir, prevenir o limitar la acción de plantas, microorganismos o animales que puedan afectar al desarrollo, rendimiento y conservación de los productos cultivados. Asimismo, algunos plaguicidas son también empleados para eliminar los parásitos que afectan a ciertos animales. El criterio más utilizado para la clasificación de los pesticidas es en función de la naturaleza de la plaga a tratar. Así, es posible hablar de herbicidas, insecticidas, fungicidas, acaricidas, rodenticidas, etc.

Estos compuestos se utilizan ampliamente en la actualidad, siendo la cantidad de dinero derivada de la venta en el mundo de este tipo de productos superior a 25.000 millones de dólares. En la figura 11 puede apreciarse la distribución de las ventas de pesticidas en función del tipo de plaguicida.



**FIGURA 11:** Ventas mundiales de pesticidas en el año 2007 [1]



## *PLAGUICIDAS: Conceptos generales*



De esta gráfica se desprende que los plaguicidas más empleados son los herbicidas, los cuales pueden usarse no sólo para el control de malas hierbas en terrenos de cultivo, sino también para la eliminación total de las plantas presentes en terrenos destinados a otros fines, como puede ser la construcción de industrias, vías férreas o carreteras, entre otros.

Si bien se conocen algunos ejemplos anteriores sobre el empleo de plaguicidas [2, 3], no fue hasta el siglo XX que la industria de los pesticidas experimentó un gran desarrollo con la introducción de compuestos como los dinitrofenoles o los herbicidas fácilmente biodegradables como los fenoxiácidos [4]. En la actualidad, la investigación en el campo de los pesticidas se orienta tanto hacia la búsqueda de nuevos compuestos más selectivos que minimicen el impacto negativo que ejercen sobre el cultivo al que deben proteger, como hacia el estudio de sus mecanismos de acción, con el fin de potenciar la resistencia del organismo a proteger [3, 5, 6]. En este sentido, cabe destacar que las cualidades ideales de todo plaguicida serían:

1. Selectividad: Aunque a veces pueda recurrirse al empleo de un plaguicida poco selectivo, en principio es deseable que éste sólo afecte a la plaga a la que va destinada sin ejercer ningún efecto dañino sobre el organismo al que pretende proteger. En el caso de los herbicidas, existen algunos que, por su modo de acción y sus características son selectivos de por sí, mientras que en otras ocasiones es necesario potenciar su selectividad controlando una serie de factores, como son el momento y el modo en que se lleva a cabo su aplicación [5]. Los fungicidas son generalmente poco selectivos, atacando de forma diversa a numerosos organismos [7]. No obstante, en algunos casos concretos puede lograrse un cierto grado de selectividad mediante el control de la cantidad de fungicida empleada.
2. Efectividad: El plaguicida aplicado debe ser suficientemente eficaz en el tratamiento de la plaga.



3. Seguridad en su manejo: En principio, el pesticida empleado no debe ser tóxico para otras plantas, animales o para el hombre.
4. Estabilidad: El plaguicida aplicado debe ser lo suficientemente estable como para poder cumplir con su cometido sin tener que recurrir a la aplicación constante del mismo.
5. Degradabilidad: Con el fin de minimizar su impacto ambiental y, por tanto, reducir los costes de tratamiento de suelos y medios contaminados, el plaguicida debe poseer un grado de degradabilidad adecuado, lo que implica que se degrade con rapidez una vez tratada la plaga a la que iba destinado.
6. Rentabilidad económica: El incremento en el rendimiento y la calidad de la cosecha obtenida por el control de las plagas se traduce en una mayor venta, que debe compensar el elevado coste que supone el empleo de los pesticidas en el tratamiento de las mismas.

A pesar de que el uso de pesticidas presenta innegables ventajas, su empleo no está exento de riesgos. Los problemas más importantes derivados del empleo de pesticidas son la falta de selectividad, la toxicidad, la aparición de especies resistentes, la persistencia en el medio ambiente, la acumulación y biomagnificación y los desequilibrios ecológicos que causan.

### **2.1.1. - SELECTIVIDAD DE LOS PESTICIDAS**

La selectividad es una de las características más deseadas en un pesticida, ya que no debe afectar al desarrollo del organismo al que trata de proteger.

Este hecho es especialmente importante en el caso de los productos empleados para el tratamiento de los parásitos en animales, ya que el mecanismo de acción





fundamental de todos ellos se basa en la inhibición de los procesos de glucólisis en los organismos [8]. En este sentido, Friedman y Platzer [9] demostraron en el año 1978 que la afinidad de los benzimidazoles por la tubulina de los parásitos era considerablemente mayor, de entre 250 y 400 veces, que la afinidad que presentan estos compuestos por la tubulina en los mamíferos, lo que hace que este tipo de fungicidas sea relativamente selectivo cuando se emplea en bajas dosis. Además, Russell y col. [10] demostraron que la velocidad de disociación del complejo mebendazol- $\beta$ -tubulina es considerablemente más rápida en el caso de los mamíferos, lo que disminuye el efecto tóxico sobre los mismos.

Se han descrito algunos herbicidas que, al presentar diferencias en el metabolismo de los herbicidas entre las malas hierbas y el cultivo de interés pueden considerarse selectivos. Así, por ejemplo, algunos compuestos en la planta a proteger pueden catalizar la degradación del herbicida, dando lugar a una rápida disminución de la concentración del mismo en la planta, de forma que la acción tóxica del mismo no se manifieste o lo haga en menor medida. Un ejemplo característico es la resistencia del maíz a las clorotriazinas en general y a la atrazina en particular. En este caso, la presencia de benzoxazinona en el maíz cataliza muy eficazmente la transformación de las clorotriazinas a las correspondientes hidroxitriazinas, que no presentan acción herbicida [5,6,11].

En los casos en los que el herbicida empleado no sea selectivo, puede lograrse un cierto grado de selectividad conociendo y explotando una serie de factores. En este sentido, es posible obtener una selectividad cronológica mediante la aplicación del herbicida en un momento concreto. Generalmente, las semillas de las malas hierbas se encuentran en las capas más superficiales y alcanzan antes la capa exterior del suelo. Si en el momento en que han aparecido las malas hierbas, pero todavía no ha despuntado la cosecha, se fumiga con un herbicida poco selectivo como el diquat, puede lograrse la eliminación de las mismas sin afectar al cultivo.

En otros casos, se puede exaltar la selectividad de un herbicida eligiendo la formulación y el modo de aplicación más adecuados. Así, por ejemplo, una planta que



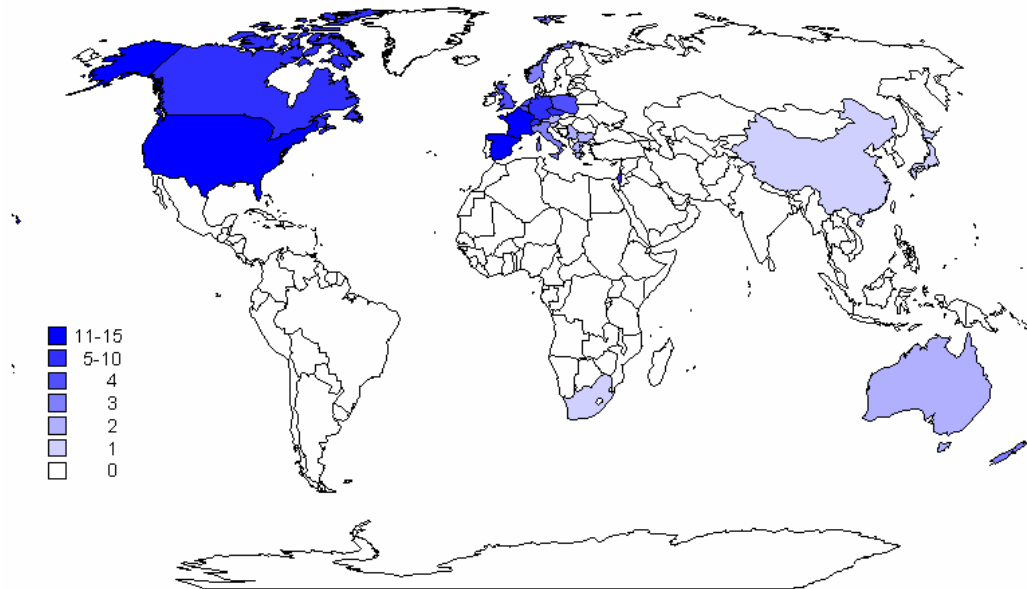
presente hojas anchas y horizontales será mucho más sensible a la acción de un herbicida que se aplique por fumigación que una planta que presente hojas estrechas y verticales, puesto que será capaz de retener el herbicida con mayor facilidad. En este mismo sentido, muchas veces se añaden surfactantes a la formulación de los herbicidas, con el fin de aumentar su mojabilidad y su permanencia en las hojas de las hierbas no deseadas.

Por último, cabe destacar que en los últimos años, los avances en ingeniería genética han demostrado ser de especial utilidad en el campo de la selectividad de los herbicidas, siendo posible hoy en día la introducción de un gen en la cosecha que potencie su resistencia a un herbicida dado. Para ello, es necesario el estudio detallado del mecanismo de acción y las posibilidades de degradación del herbicida aplicado, así como una evaluación de los posibles “efectos secundarios” del empleo de los denominados organismos genéticamente modificados.

### **2.1.2. - RESISTENCIA DE LAS PLAGAS**

El abusivo empleo que se ha hecho de los pesticidas en los últimos años ha favorecido el desarrollo de mecanismos de defensa por parte de las plagas que, en muchos casos, han conseguido hacerse resistentes a los mismos. Es por ello que los agricultores y los ganaderos deben emplear mezclas de pesticidas o dosis cada vez mayores de los mismos para conseguir el mismo resultado.

A modo de ejemplo, se muestra en la figura 12 un mapa con las zonas en las que, debido a un mayor empleo de herbicidas triazínicos, han aparecido malas hierbas resistentes a los mismos.



**FIGURA 12:** Abundancia de especies de malas hierbas resistentes a triazinas [12]

### **2.1.3. - TOXICIDAD E IMPACTO AMBIENTAL DE LOS PESTICIDAS**

Aunque en principio es deseable que los pesticidas empleados sólo actúen sobre la plaga a la que van destinados (malas hierbas, insectos, roedores, parásitos, hongos...) pueden llegar a ejercer un efecto más o menos negativo sobre la salud de los organismos vivos.

A la hora de evaluar la toxicidad de un compuesto es necesario conocer algunas características relacionadas con su asimilación por los organismos vivos y el tipo de reacciones adversas a las que puede dar lugar una vez asimilado. En este sentido conviene evaluar su acumulación en tejidos, su acción irritante sobre determinados órganos (ojos, piel, pulmones, etc.), su persistencia, así como las posibles transformaciones y los productos a los que puede dar lugar.

Por otro lado, resulta necesario distinguir entre toxicidad aguda, cuyos efectos se ponen de manifiesto inmediatamente después de la intoxicación, y toxicidad crónica, en



la que los efectos se manifiestan un cierto período después de una exposición continua a una pequeña dosis del tóxico. Por lo general, la evaluación de la toxicidad aguda de un pesticida se realiza determinando el LD<sub>50</sub>, el cuál corresponde a la cantidad de plaguicida necesario para matar a la mitad de la población. Estos estudios se efectúan generalmente con ratas y se extrapolan posteriormente a otros animales y al hombre. En la tabla 7 se muestra el número de insecticidas, fungicidas y herbicidas clasificados en 5 categorías en función de su toxicidad aguda medida como el valor del LD<sub>50</sub> en ratas [13].

**TABLA 7: Clasificación de los pesticidas en función de su toxicidad en ratas**

<b>Categoría</b>	<b>Ia</b>	<b>Ib</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>III+</b>
<b>LD<sub>50</sub></b>	<b>(&lt;5mg/Kg)</b>	<b>(5-50mg/Kg)</b>	<b>(50-500mg/Kg)</b>	<b>(&gt;500mg/Kg)</b>	<b>(&gt;2000mg/Kg)</b>
<b>Insecticidas</b>	26	51	62	13	13
<b>Fungicidas</b>	6	5	21	30	67
<b>Herbicidas</b>	0	5	26	57	119

*Ia: extrema, Ib: alta, II: moderada, III: ligera, III+: improbable*

Como se refleja en la tabla, la mayoría de los fungicidas y de los herbicidas no se clasifican dentro de los grupos de alta toxicidad aguda. No obstante, aún a pesar de que los valores de LD<sub>50</sub> son tan altos que es necesario someter al organismo a concentraciones muy altas de estos compuestos para que se manifiesten efectos agudos de toxicidad, su abuso en los últimos años ha provocado la aparición de diversos efectos tóxicos crónicos en los organismos, lo que ha desencadenado un considerable impacto ambiental.

La toxicidad crónica de un determinado pesticida se evalúa en función de la máxima dosis diaria aceptable (ADI), la cual se calcula a partir de la máxima dosis para la que no se han descrito efectos secundarios a largo plazo (NOEL) [6]. En general, se puede afirmar que los efectos debidos a la toxicidad crónica de un compuesto son, a la larga, considerablemente más perjudiciales para el organismo que aquellos derivados de una exposición aguda puntual al plaguicida.



## *PLAGUICIDAS: Conceptos generales*



Los pesticidas pueden ejercer su efecto tóxico a distintos niveles. Así, por ejemplo, algunas triazinas pueden actuar como disruptores endocrinos y otros plaguicidas como el  $\gamma$ -lindano, son potentes agentes carcinogénicos y teratogénicos. La inmensa mayoría de los insecticidas pueden afectar al sistema neurológico, otros provocan graves trastornos en la mucosa de la piel, ojos y en los sistemas respiratorio y digestivo, etc. [14-17]. La toxicidad de las triazinas y los benzimidazoles se describe en los apartados III.2.2.2. y III.2.3.2., respectivamente.

La preocupación por la presencia de este tipo de compuestos en el medio ambiente es tal que en los últimos años se han promulgado numerosas leyes que regulan el límite máximo de los mismos en aguas y/o alimentos destinados al consumo humano [18-21]. En el caso de los vegetales, la legislación española establece unos límites máximos de residuos (LMRs) que dependen tanto del herbicida como del vegetal del que se trate. Para las triazinas, dichos valores oscilan entre 0.02 y 0.1 mg/Kg, mientras que los niveles legislados para los benzimidazoles oscilan entre 0,1 y 15 mg/Kg [18]. Es importante mencionar que estos valores están en continua revisión y, en el caso de que se concrete algún efecto tóxico relevante, el límite máximo permitido para ese compuesto se disminuye considerablemente.

Por otra parte, es de destacar que tanto la atrazina como la simazina aparecen recogidos en la lista de contaminantes considerados como prioritarios por la Unión Europea [19], y que deben ser monitorizados en aguas superficiales, por su alta persistencia y/o toxicidad. Dicha lista se muestra en la tabla 8:



**TABLA 8: Lista de contaminantes orgánicos prioritarios en la Comunidad Europea**

Alaclor	Diclorometano	Naftaleno
Antraceno	Di-(2-etilhexil)ftalato	Nonilfenoles
<u>Atrazina</u>	Diurón	Octilfenoles
Benceno	Endosulfán	Pentaclorobenceno
Difeniléteres policromados	a-endosulfán	Pentaclorofenol
Cadmio y derivados	Fluoranteno	PAHs
C <sub>10-13</sub> cloroalcanos	Hexaclorobenceno	<u>Simazina</u>
Clorofenvinfos	Hexaclorociclohexano	Triclorobencenos
Cloropirifos	γ-lindano	Triclorometano
1,2-dicloroetano	Isoproturón	Trifluralina

A pesar de que no aparecen recogidos, la directiva europea indica la importancia de determinar los productos de degradación tanto de los herbicidas (triazínicos, fenoxiácidos clorados) como de los insecticidas (carbamatos, organofosforados).

La lista establecida por la EPA [22] resulta más completa en este sentido, puesto que incluye los principales productos de degradación, así como una recomendación sobre los métodos de análisis más adecuados para cada grupo de pesticidas. Esta lista incluye todos los pesticidas usados en cantidades mayores a 7000 toneladas/año, cuya solubilidad en agua es superior a 30 mg/l o su tiempo de vida de hidrólisis mayor de 25 semanas [23]. La lista se muestra en la tabla 9 y en ella se encuentran, entre otros, diversas triazinas (ametrín, atrazina, cianazina, propazina, simazina...).



**Tabla 9: Lista de contaminantes orgánicos prioritarios en EEUU (EPA)**

Acenaftaleno	Carbaril	Diclorobenceno
Acifluorfenó	Carbofurano	Diclorodifluorometano
Acrilamida	Carboxin	Dicloroetano
Acrilonitrilo	<u>Cianazina</u>	Dicloroetileno
Alaclor	Cloramben	Diclorometano
Aldicarb y derivados	Clordano	Diclorofenol
Aldrín	Cloroformo	Dicloropropano
<u>Ametrín</u>	2-clorofenol	Dicloropropeno
Antraceno	2,4-diclorofenoxiacético	Dieldrín
<u>Atrazina</u>	2,4,5-triclorofenoxiacético	Dietilftalato
Baygon	Clorometano	Di(2-etilhexil)adipato
Benceno	Clorotalonil	Di(2-etilhexil)ftalato
Bentazon	o- y p-clorotolueno	Difenamida
Benzo[α]antraceno	Clorpirifos	Diisopropilmetilfosfonato
Benzo[a]pireno	Cloruro de cianógeno	<u>Dimetrín</u>
Benzo[b]fluoranteno	Cloruro de vinilo	Dimetilfosfonato
Benzo[k]fluoranteno	Criseno	Dimetilftalato
Benzo[g,h,i]perileno	Cumeno	Dinitrobenceno
Bis-2-cloroisopropilo eter	Dactal	Dinitrotolueno
Bromacil	Dalapon	Dinoseb
Bromobenceno	Diazinon	Dioxano
Bromoclorometano	Dibromoclorometano	Diquat
Bromodiclorometano	Dibromocloropropano	Disulfoton
Bromoformo	Dibromoetileno	Ditiano
Bromometano	Dibutilftalato	Diurón
Butilbencilftalato	Dicamba	Endotal
Butilato	Dicloroacético	Endrín



**Tabla 9 (cont.): Lista de contaminantes orgánicos prioritarios en EEUU (EPA)**

Epiclorohidrina	Malatión	Profam
Estireno	MCPA	RDX
Etilbenceno	Metomil	<u>Simazina</u>
Etilenglicol	Metoxiclor	Sulfamato amónico
Etilentiourea	Metiletilcetona	2,3,7,8-TCDD (Dioxina)
Fenamifos	Metilparatión	Tebutiurón
Fenol	Metolaclor	Terbacil
Fenantreno	<u>Metribuzín</u>	Terbufos
Fluometurón	Monocloroacético	Tetracloroetano
Fluoreno	Monoclorobenceno	Tetracloroetileno
Fonofos	Naftaleno	Tetracloruro de carbono
Formaldehído	Nitrocelulosa	Triclorofluorometano
Glifosat	Nitroguanidina	Tolueno
Heptaclor y derivados	Nitrofenol	Toxafeno
Hexaclorobenceno	Oxamil	Tricloroacético
Hexaclorobutadieno	Paraquat	Triclorobenceno
Hexaclorociclopentadieno	Pentaclorofenol	Tricloroetano
Hexacloroetano	Picloram	Tricloroetileno
Hexano	Pireno	Triclorofenol
Hexazinona	Picloram	Tricloropropano
Hidrazida maléica	PCBs	Trifluralín
Indeno	<u>Prometón</u>	Trimetilbenceno
Isoforona	Pronamida	Trinitroglicerol
Isopropilmetilfosfonato	Propaclor	TNT
Lindano	<u>Propazina</u>	Xileno





## *PLAGUICIDAS: Conceptos generales*

---



Las variaciones en el consumo de los plaguicidas hace que estas listas estén bajo continua revisión. Así, por ejemplo, en el año 2000 se eliminó el DDT de la lista de plaguicidas prioritarios de la Comunidad Europea debido a la disminución de los niveles de este compuesto tras su prohibición en 1972. Por otro lado, la EPA está actualmente evaluando la posibilidad de introducir otros compuestos triazínicos como el prometrín [24].

En muchas ocasiones, el empleo de pesticidas se realiza en dosis muy superiores a las realmente necesarias. Esto, unido al hecho de que la degradación de muchos de estos compuestos es difícil o imposible conduce a su acumulación en el medio ambiente. Por otra parte, el carácter más o menos lipofílico de la mayoría de los pesticidas posibilita su acumulación en los tejidos grasos de los animales, lo que conduce a una biomagnificación a lo largo de la cadena trófica.

Por último, hay que tener en cuenta que, al inducir la desaparición de unas especies determinadas mediante el empleo de plaguicidas se altera el ecosistema, pudiendo aparecer y desaparecer muchas otras especies en el mismo.



## *2.2. - HERBICIDAS*

Los herbicidas son el tipo de pesticidas más comúnmente empleados en la actualidad, representando alrededor del 50% del consumo total de plaguicidas.

### *2.2.1. - CLASIFICACIÓN*

Los criterios más empleados para la clasificación de los herbicidas son los basados en su modo de acción y en su estructura química.

Así, por ejemplo, atendiendo al modo de penetración del herbicida en la planta, podemos dividirlos en tres grandes grupos:

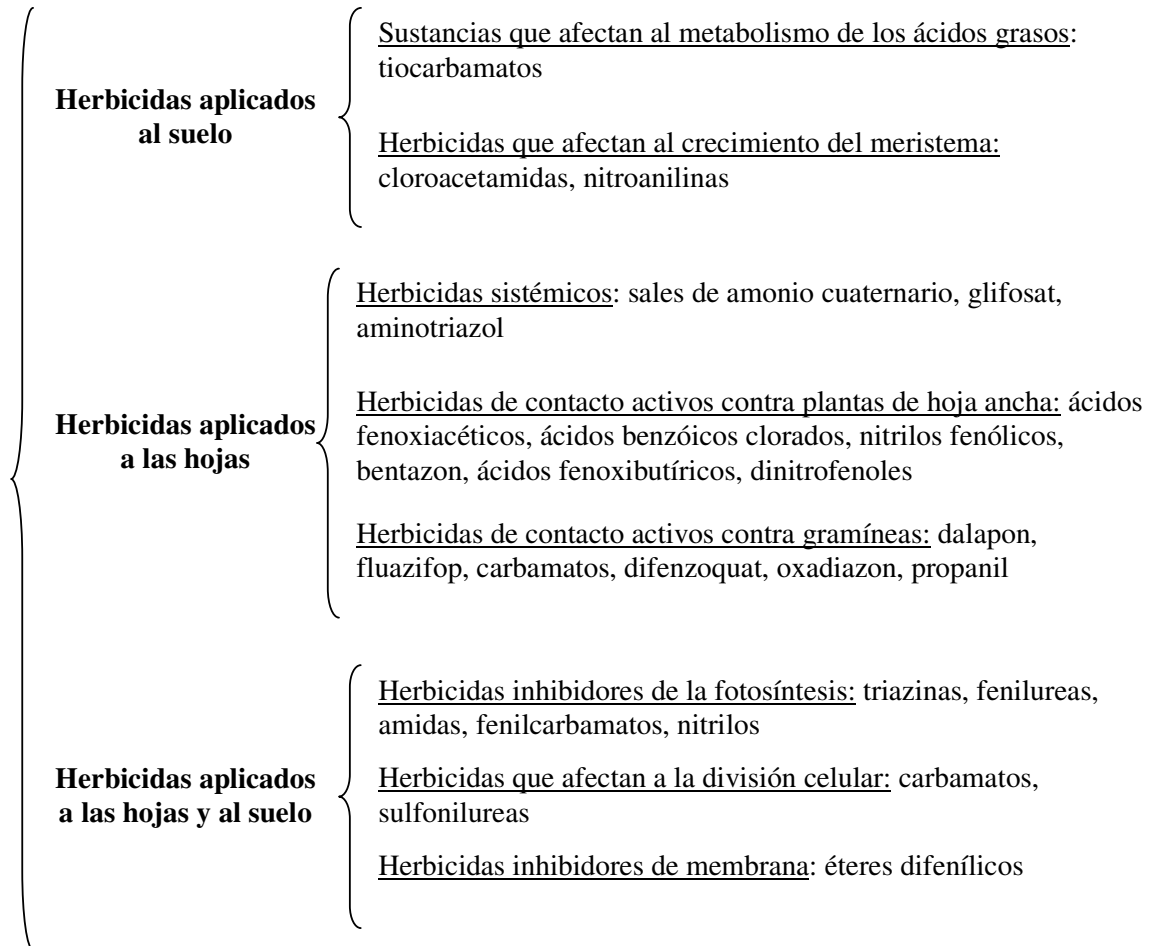
- a) herbicidas que, por poseer un cierto carácter hidrofílico pueden penetrar en la planta por absorción a través de sus raíces y, por tanto, pueden aplicarse directamente al suelo.
- b) herbicidas que, al ser más apolares, penetran a través de las hojas de las plantas, siendo su modo de aplicación más habitual la fumigación.
- c) herbicidas que, dadas sus propiedades, pueden absorberse tanto a través de las raíces como de las hojas, por lo que pueden aplicarse directamente sobre el suelo o bien fumigarlos sobre las hojas.

Dentro de estos grupos, los herbicidas se dividen en función de su mecanismo de acción, como puede ser la inhibición de la fotosíntesis (triazinas o fenilureas), la estimulación descontrolada del crecimiento de la planta (derivados del ácido fenoxiacético) o herbicidas que afectan al metabolismo de los ácidos grasos (tiocarbamatos).

En la figura 13 puede verse una clasificación de los herbicidas en función de su mecanismo de acción preferente [6]:



**PLAGUICIDAS:**  
**Herbicidas**



**FIGURA 13: Clasificación de los herbicidas en función de su mecanismo de acción**

Por otro lado, si se atiende a la estructura química, los herbicidas se pueden clasificar en [5, 6]:

⇒ Compuestos organofosforados, derivados del ácido fosfórico, se utilizan en la defensa de un gran número de cultivos actuando a través de las hojas del vegetal. Cabe destacar que su uso más habitual es como insecticidas y que actúan inhibiendo la transmisión del impulso nervioso, pueden afectar al ser humano, por lo que hay que tomar una serie de precauciones a la hora de trabajar con este



## *PLAGUICIDAS: Herbicidas*



tipo de compuestos. Entre los ejemplos más característicos se encuentran el butamifos y el glifosat.

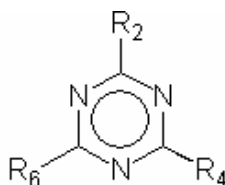
- ⇒ Derivados de la urea, como las fenilureas, cuya acción herbicida se debe fundamentalmente a la inhibición de la fotosíntesis y, por lo general, son poco tóxicos. Entre los más utilizados se encuentran el linurón, el monurón y el fenurón.
- ⇒ Derivados del ácido fenoxiacético, que se caracterizan por ser los herbicidas de menor toxicidad para los animales y el ser humano, pero tienen el inconveniente de ser muy poco selectivos. Al poseer una estructura similar a la de las auxinas (hormonas de crecimiento vegetal), son capaces de inducir un crecimiento descontrolado de la planta, que conduce a su muerte. Ejemplos típicos de esta familia son el 2,4-D y el 2,4,5-T.
- ⇒ Compuestos bipiridínicos, se utilizan fundamentalmente para erradicar las malas hierbas del terreno antes de la siembra del cultivo. Son herbicidas muy poco selectivos que actúan induciendo reacciones fotoquímicas en la planta que conducen a la formación de radicales libres. Los herbicidas más representativos de esta familia son el diquat y el paraquat.
- ⇒ Compuestos fenólicos, se han utilizado ampliamente para el control de las malas hierbas de hoja ancha, al actuar por contacto a través de las hojas. Los compuestos fenólicos más utilizados han sido el dinoseb y el pentaclorofenol, si bien el empleo más habitual de este último lo constituye la protección de los bosques contra la acción de gusanos filiformes y otros insectos.
- ⇒ Nitroanilinas como el trifluralín se utilizan frecuentemente en el control de gramíneas en cultivos de algodón, girasol, hortalizas y plantas ornamentales.



- ⇒ Carbamatos y tiocarbamatos como el cloroprofam y el barbam se caracterizan por su baja persistencia en el terreno y su baja toxicidad para los animales superiores, por lo que se han usado ampliamente como herbidas, fundamentalmente en el control de las gramíneas.
- ⇒ Por último, los compuestos triazínicos se encuentran entre los herbidas más utilizados en la protección de cultivos como el maíz, café, cítricos, sorgo, etc. Son herbidas inhibidores de la fotosíntesis que pueden actuar tanto por contacto con las hojas como a través de las raíces.

### 2.2.2. - TRIAZINAS

Las s-triazinas son un grupo de herbidas que poseen una estructura común basada en un anillo triazínico (figura 14):



**FIGURA 14: Fórmula general de las s-triazinas**

Son compuestos sólidos de baja presión de vapor a temperatura ambiente que se descomponen a temperaturas próximas a los 150°C. Su polaridad varía en función de la naturaleza de los distintos sustituyentes del anillo triazínico, fundamentalmente del sustituyente en la posición 2 y de la simetría de la molécula. La solubilidad en agua de estos compuestos está estrechamente relacionada con su polaridad, siendo mayor en el caso de las 2-metoxitriazinas y de las 2-hidroxitriazinas, y menor en las 2-tiometiltiazinas y las 2-clorotriazinas. Además, la solubilidad disminuye considerablemente en el caso de las triazinas simétricas [25,26].

En la tabla 10 se recogen algunas de las triazinas más comunes, su nombre comercial y sus sustituyentes.



**TABLA 10: Nombre comercial y sustituyentes de las triazinas más comunes**

TRIAZINA	SUSTITUYENTE		
	R <sub>2</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>6</sub>
Ametrín	-SCH <sub>3</sub>	-NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-NH <sup>i</sup> Pr
Anilazina	-Cl	-Cl	-NHC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl
Atrazina	-Cl	-NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-NH <sup>i</sup> Pr
Clorazina	-Cl	-N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	-N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>
Cianazina	-Cl	-NHC(CN)(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Ciromazina	-NHC <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	-NH <sub>2</sub>	-NH <sub>2</sub>
Prometón	-OCH <sub>3</sub>	-NH <sup>i</sup> Pr	-NH <sup>i</sup> Pr
Prometrín	-SCH <sub>3</sub>	-NH <sup>i</sup> Pr	-NH <sup>i</sup> Pr
Propazina	-Cl	-NH <sup>i</sup> Pr	-NH <sup>i</sup> Pr
Simazina	-Cl	-NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Simetrín	-SCH <sub>3</sub>	-NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Terbutilazina	-Cl	-NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-NHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
Terbutrín	-SCH <sub>3</sub>	-NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-NHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
Trietazina	-Cl	-N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	-NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>

### Mecanismo de acción

Las triazinas son herbicidas sistémicos que actúan principalmente tras su absorción radicular. Por ello, pueden aplicarse directamente sobre el suelo como tratamiento pre-emergencia, en el pequeño intervalo de tiempo que transcurre entre la siembra y la germinación del cultivo. Una vez absorbidas a través de la raíz, las triazinas se distribuyen por acción de la savia hasta el extremo de las hojas, donde interfieren con el sistema enzimático del proceso de fotólisis del agua, inhibiendo así la actividad fotosintética de las plantas [27]. Otra vía de entrada, menos importante que la



## *PLAGUICIDAS: Herbicidas*



anterior, es su penetración por absorción a través de las hojas de las plantas, por lo que pueden aplicarse mediante fumigación de las mismas.

La acción herbicida de las triazinas se debe a su capacidad para inhibir la denominada reacción de Hill [28]. En condiciones normales, la plastoquinona se reduce a plastoquinol por la acción del enzima NADH-plastoquinona oxidoreductasa. Al unirse las triazinas al centro activo de esta enzima, actúan de inhibidores competitivos del proceso, disminuyendo su velocidad.

Al tratarse de herbicidas fotosintéticos, es de esperar que las triazinas actúen sobre todos los organismos fototrofos, por lo que su acción no debería ser selectiva. Sin embargo, existen una serie de plantas como el maíz, que son capaces de degradar rápidamente los compuestos triazínicos a las correspondientes hidroxitriazinas, disminuyendo eficazmente su actividad herbicida [5,6,11]. Además, el carácter más o menos selectivo de estos compuestos varía considerablemente con la dosis empleada [29].

### *Degradación en el medio ambiente*

A la hora de evaluar la contaminación de un ecosistema es de gran importancia tener en cuenta que, después de su aplicación, un herbicida puede transformarse por medio de un proceso químico, físico o microbiológico, en otro tipo de compuestos de mayor o menor toxicidad que el producto de partida, y que por tanto también deben tenerse en cuenta.

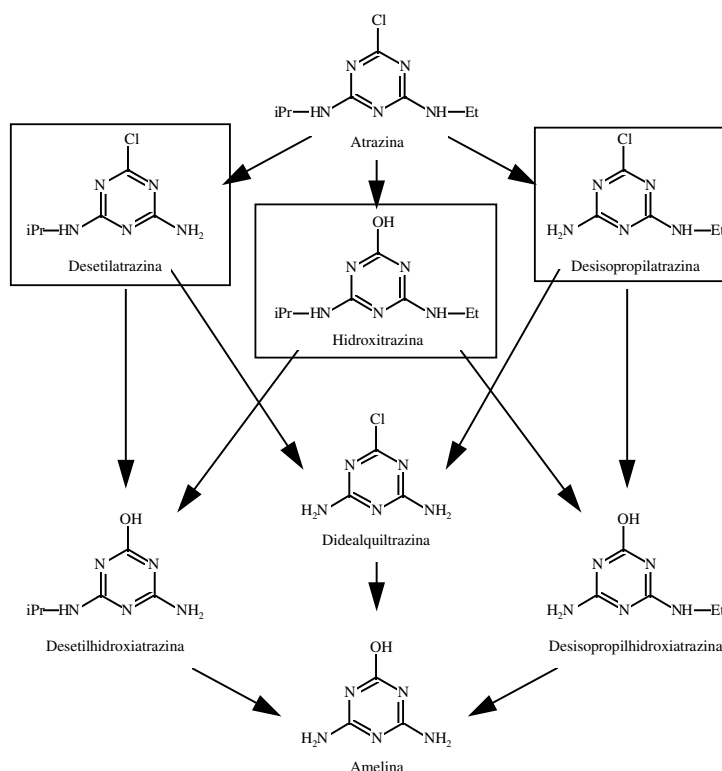
En el caso de los herbicidas triazínicos, las rutas de degradación más habituales incluyen la degradación fotoquímica a hidroxitriazinas o los procesos de desalquilación reductora mediados por microorganismos o por la presencia de compuestos reductores en el medio. En condiciones normales, la ruta principal de la degradación de este tipo de compuestos es su hidrólisis fotoquímica, por lo que generalmente los productos de degradación más abundantes en el medio ambiente son derivados hidroxilados [29].



El producto final de la degradación depende, entre otros factores, de cuál haya sido el microorganismo responsable de la misma y de las condiciones físico-químicas del medio. Asimismo, es importante tener en cuenta que la velocidad de estos procesos depende considerablemente de la concentración de oxígeno en el medio, ya que se ralentizan al disminuir la cantidad de oxígeno disponible. Esto ocurre, por ejemplo, en el caso de las aguas subterráneas o al aumentar la profundidad en el suelo [30].

Por otro lado, la formación de los derivados hidroxilados disminuye tanto su carácter herbicida como su toxicidad para los animales. Sin embargo, los procesos de desalquilación reductora no producen alteración alguna en estas propiedades [5].

En la figura 15 se recogen las distintas vías de degradación de la atrazina.



**FIGURA 15: Principales vías de degradación de la atrazina**

Los principales productos de degradación de la atrazina son la hidroxiatrazina, la desetilatrazina y la desisopropilatrazina. En la mayor parte de los casos, la





## *PLAGUICIDAS: Herbidas*



hidroxiatrazina es el principal producto de la degradación. Sin embargo, en medios fuertemente reductores como las aguas subterráneas, los principales productos de degradación de las aguas son la desetilatrazina y la desisopropilatrazina [29].

### *Persistencia y movilidad en el medio ambiente*

La persistencia y distribución de un herbicida en las distintas áreas del medio ambiente viene determinada por sus propiedades físico químicas y por las condiciones del terreno sobre el que se aplicaron. Además de los procesos de degradación, pueden producirse fenómenos de volatilización, adsorción en suelos con un alto contenido en materia orgánica o arcillas, filtrado hacia las aguas subterráneas, lavado hacia las aguas de superficie como consecuencia de la lluvia, etc. [6]. En el caso de las triazinas, su baja presión de vapor hace que el proceso de volatilización sea poco probable. Sin embargo, se han detectado triazinas en suelos y aguas naturales, tanto superficiales como subterráneas, en numerosas ocasiones [31].

La persistencia de las triazinas en los suelos, puede oscilar desde unos pocos días a varios meses e incluso varios años [6], depende de multitud de factores, entre los que pueden citarse el pH del suelo, el contenido en materia orgánica y arcilla, la porosidad, la humedad del medio, el modo y frecuencia de aplicación del herbicida, su hidrofobicidad y la intensidad y frecuencia de las lluvias [32].

Las vías por las que un herbicida puede alcanzar y contaminar las aguas naturales son muy numerosas. La velocidad de estos procesos depende fundamentalmente de la climatología, de las condiciones del terreno y de las propiedades del herbicida aplicado. En este sentido, un terreno escarpado en el que se den lluvias frecuentes o de gran intensidad favorecerá el lavado de los herbicidas hacia las aguas superficiales, mientras que los terrenos porosos o en los que las lluvias son escasas o de poca intensidad puede tener lugar la filtración del herbicida hacia las aguas subterráneas.



*PLAGUICIDAS:  
Herbicidas*



***Toxicidad***

En general, las triazinas son herbicidas poco tóxicos para los animales o los seres humanos. No obstante, entre los posibles efectos tóxicos que pueden surgir como consecuencia de la exposición crónica a atrazina se han descrito [33]:

- Fallos hepáticos, en riñón y corazón
- Posibles malformaciones en el feto
- Retraso en el desarrollo del feto
- Alteraciones hormonales

Por último, y aunque los resultados no son del todo concluyentes, se ha asociado la contaminación crónica con triazinas con un incremento de la posibilidad de desarrollar cáncer de ovario [34].

En la tabla 11 se recogen los valores de LD<sub>50</sub> en ratas para algunas de las triazinas más empleadas [35].



*PLAGUICIDAS:  
Herbidas*



*TABLA 11: Valores de LD<sub>50</sub> de triazinas (mg/kg)*

TRIAZINA	LD <sub>50</sub> (mg/kg)
Ametrín	508 (machos) – 590 (hembras)
Anilazina	> 5000
Atrazina	1750
Cianazina	182 – 380 (ingesta oral)
Prometón	2160 – 2980 (ingesta oral)
Prometrín	3750
Propazina	> 5000
Simazina	5000
Simetrín	1830
Terbutilazina	> 5000
Terbutrín	> 5000
Trietazina	1750



## *2.3. - FUNGICIDAS*

### *2.3.1. - CLASIFICACIÓN*

Al igual que en el caso de los herbicidas, los criterios más empleados para la clasificación de los fungicidas tienen en cuenta tanto el modo de acción como la estructura química de los mismos.

Así, por ejemplo, atendiendo al modo de acción, es posible dividir los fungicidas en nueve grandes grupos [7]:

- ⇒ Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos: fenilamidas, hidrox-2-aminopirimidinas, compuestos heteroaromáticos (isotiazolonas, isoxazoles) y algunos ácidos carboxílicos
- ⇒ Fungicidas que dificultan el proceso de mitosis celular: benzimidazoles, tiofanatos, N-fenilcarbamat, benzamidas y algunas fenilureas
- ⇒ Inhibidores de la respiración celular: pirimidinaminas, carboxamidas, dinitroanilinas, compuestos organoestánicos...
- ⇒ Inhibidores de la síntesis de aminoácidos y proteínas: anilino-pirimidinas y algunos antibióticos (tetraciclina, estreptomicina, ácido enopiranurónico, kasugamicina...)
- ⇒ Inhibidores de la transducción: quinolinas, fenilpirroles, dicaboximidas...
- ⇒ Inhibidores de la síntesis de la membrana bilipídica: dicarboximidas, ditiolanos, fosfotiolatos, diazoles, carbamatos...



## *PLAGUICIDAS: Fungicidas*



- ⇒ Inhibidores de la síntesis de colesterol: triazoles, morfolinas, piperidinas, spiroxamina, hidroxianilidas, tiocarbamatos, alilaminas...
- ⇒ Inhibidores de la síntesis de glucosa: algunos antibióticos (validamicina) y polioxinas
- ⇒ Inhibidores de la síntesis de melanina: isobenzofurano, pirroloquinolinona, triazolobenzotiazol, carpropamida, carboxamidas, propanamidas...

Atendiendo a la estructura química [36], los fungicidas se dividen en:

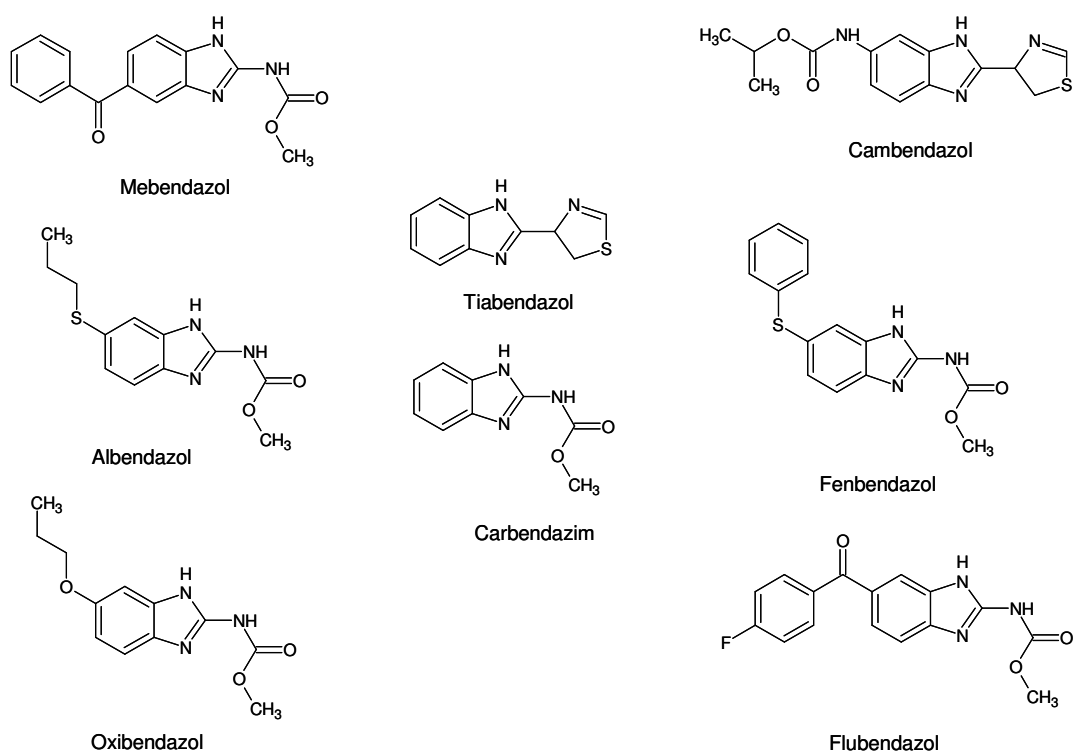
- Benzimidazoles: benomil, tiabendazol, carbendazim, tiofanaltometil, albendazol...
- Dicarboximidas: iprodiona, vinclozolina
- Fenilpirroles: fludioxonil
- Anilino-pirimidinas: ciprodinil
- Hidroxianilidas: fenhexamida
- Fenilamidas: metalaxil, mfenoxam, oxadixyl
- Fosfonatos: fosetyl-Al, ácido fosforoso
- Piperazinas: triforina
- Pirimidinas: fenarimol
- Imidazoles: triflumizol, imazalil
- Triazoles: ciproconizol, difenoconazol, fenbuconazol, triadimefon
- Piperidinas: piperalina
- Strobilurinos: azoxystrobin, kresoxim-metil, trifloxystrobin
- Sales de cobre: hidróxido de cobre, óxido de cobre, sulfato de cobre, carbonato amónico de cobre
- Sulfuro de calcio
- Etilenbisditiocarbamatos (EBDC) y similares: maneb, mancozeb, thiram, ferbam, ziram...
- Aromáticos: pentacloronitrobenceno
- Ftalimidas: captan
- Guanidinas: dodine



### 2.3.2. - BENZIMIDAZOLES

Los benzimidazoles se han empleado ampliamente en la prevención y tratamiento de las enfermedades infecciosas ocasionadas por numerosos tipos de parásitos, así como en el control de una amplia variedad de hongos que afectan a las frutas y vegetales almacenados para su comercialización [8].

En la figura 16 se recogen las fórmulas de los benzimidazoles más utilizados.



**FIGURA 16: Fórmulas de los benzimidazoles más utilizados**



### *Mecanismo de acción*

Aunque se han descrito numerosos mecanismos de acción de los benzimidazoles sobre los parásitos, la mayoría se basan en la ralentización, en mayor o menor medida, del proceso de glucólisis, de forma que el parásito muere por falta de energía al agotarse las reservas de glucógeno e interrumpirse la formación de ATP.

Así, por ejemplo, se ha demostrado que el albendazol [37], el mebendazol [38] o el tiabendazol [38] bloquean la absorción de glucosa. Además, se sabe que la mayor parte de los benzimidazoles actúan como inhibidores del enzima fumarato reductasa [39], responsable de la formación del ácido succínico, disminuyendo considerablemente la eficacia del ciclo de los ácidos dicarboxílicos y alterando, de manera indirecta, el principal mecanismo de producción de ATP en los parásitos [40].

Un mecanismo de acción complementario se basa en la destrucción de los microtúbulos celulares [37,41,42] que intervienen, entre otras muchas funciones, en la mitosis celular, en la movilidad de las células, en la absorción de los nutrientes y en la excrección de los desechos celulares [43]. Dada la importancia de estas funciones, la destrucción de los microtúbulos tras la unión de los benzimidazoles a la  $\beta$ -tubulina conduce directamente a la muerte del parásito [44,45], sin apenas efecto sobre el organismo a proteger, ya que la afinidad de los benzimidazoles por la  $\beta$ -tubulina de los parásitos es muy superior que la de cualquier otro organismo [9].

### *Degradación y metabolismo*

La degradación de los benzimidazoles puede dar lugar a la formación de numerosos compuestos, ya que pueden sufrir procesos de oxidación, reducción e hidrólisis.

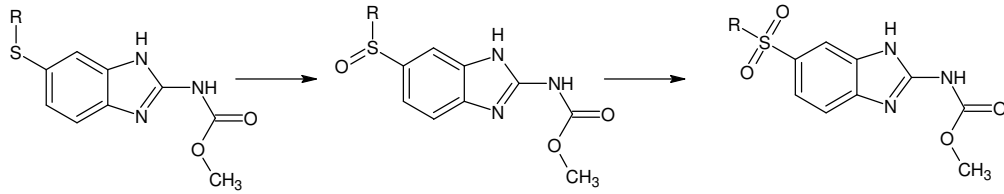
Las principales rutas metabólicas de los benzimidazoles más utilizados aparecen recogidas en la figura 17.



**PLAGUICIDAS:**  
**Fungicidas**

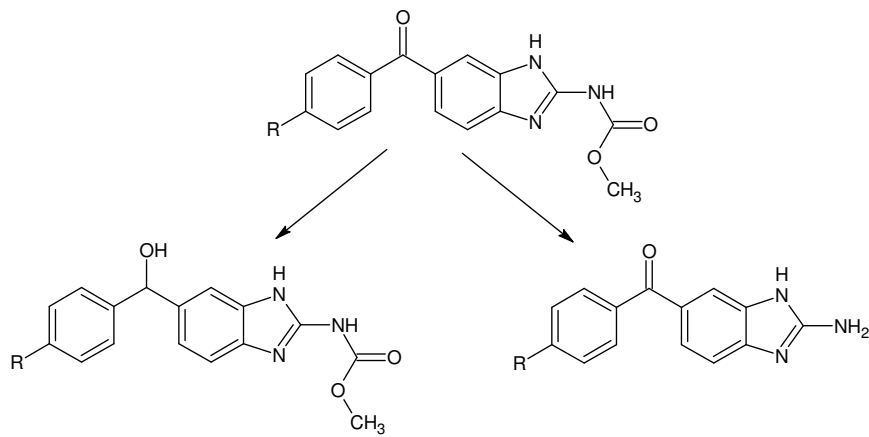


a)



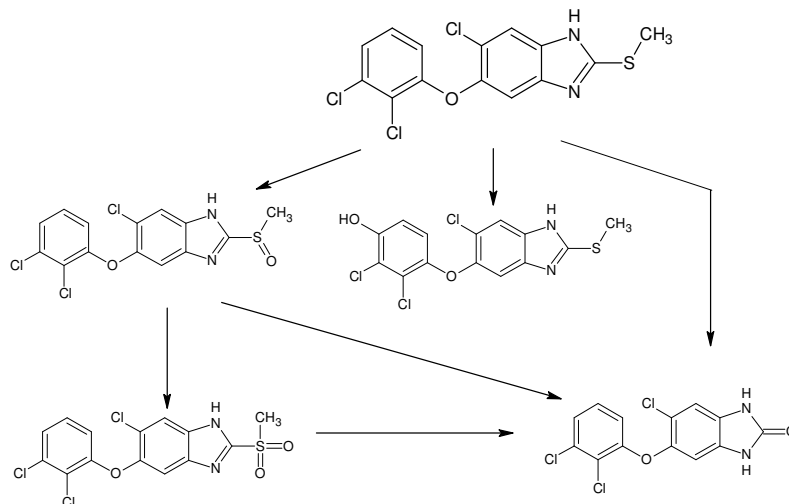
Degradación del albendazol (R = propilo) y fenbendazol (R = fenilo)

b)



Degradación del flubendazol (R=F) y mebendazol (R=H)

c)



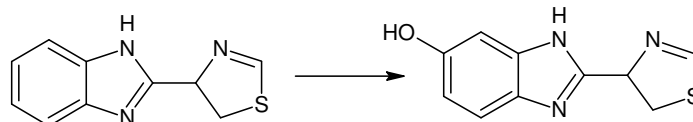
Degradación del triclabendazol

**FIGURA 17: Mecanismos de degradación de los benzimidazoles**



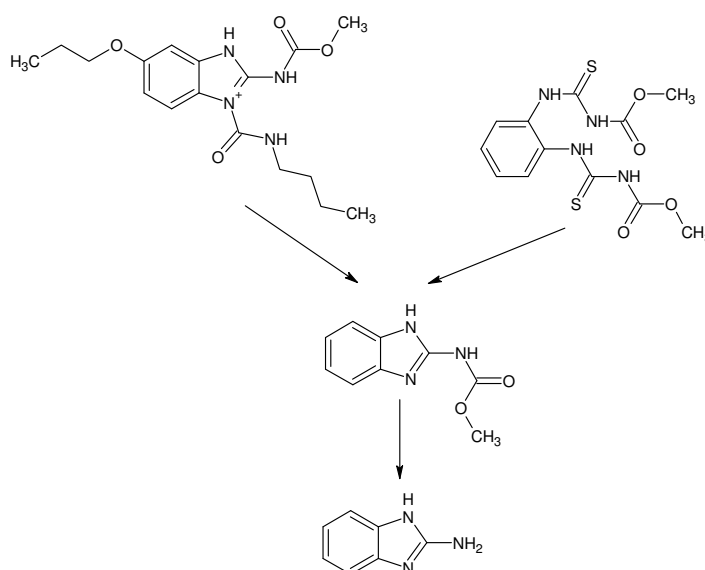


d)



Degradación del tiabendazol

e)



Degradación del benomil, tiofanatometilo y carbendazim

**FIGURA 17 (continuación): Mecanismos de degradación de los benzimidazoles**

### Toxicidad

Los valores de LD<sub>50</sub> en ratas [35] de este tipo de compuestos son bastante elevados (tabla 12) lo que implica que casi nunca se manifiestan efectos agudos de toxicidad, debido a la elevada cantidad de benzimidazol que debe administrarse [46]. Por otro lado, en lo que se refiere a la toxicidad crónica de estos compuestos, el principal efecto tóxico es su marcada teratogeneicidad, que fue inicialmente descrita en la contaminación crónica por parabendazol [47]. Así, se han descrito múltiples casos de



malformaciones congénitas por la administración elevada de cambendazol [48], oxfendazol [49] o albendazol [50] durante la gestación. Asimismo, se ha demostrado que el oxibendazol produce poliploidía [51], por lo que dada la gravedad de las malformaciones, su uso se restringe exclusivamente al tratamiento de los casos más extremos, donde el tratamiento con otros benzimidazoles no haya dado resultado.

Otros posibles efectos crónicos producidos por la exposición continuada a benzimidazoles son diarrea [52], anemia [53], edemas pulmonares [54] o linfadenopatía necrotizante [54].

Algunos de los metabolitos de los benzimidazoles han demostrado ser más tóxicos que el producto de partida. Así, por ejemplo, se sabe que el efecto teratogénico del hidroximebendazol o el oxfendazol es considerablemente mayor que el del mebendazol o el fenbendazol, respectivamente [55], por lo que no sólo es necesario evaluar la concentración del benzimidazol de partida, sino la de todos sus metabolitos.

**TABLA 12: Valores de  $LD_{50}$  en ratas de benzimidazoles (mg/kg)**

<b>BENZIMIDAZOL</b>	<b><math>LD_{50}</math> (mg/kg)</b>
Albendazol	> 10000
Benomil	9590
Cambendazol	> 10000
Carbendazim	> 10000
Fenbendazol	> 10000
Flubendazol	2560
Mebendazol	40
Oxfendazol	6400
Oxibendazol	> 10000
Tiabendazol	3100
Triclabendazol	> 10000



## 2.4. - BIBLIOGRAFÍA

1. CropLife International Annual Report 2006-2007
2. <http://www.carleton.ca/~bgordon/rice/papers/PEN684.htm>
3. L.G. Copping, H.G. Hewitt, “*Chemistry and mode of action of crop protection agents*”, Royal Society of Chemistry, 1998, cap. 1
4. [http://www.fcagr.unr.edu.ar/malezas/Apuntes/Herbicidas\\_Hormonales.doc](http://www.fcagr.unr.edu.ar/malezas/Apuntes/Herbicidas_Hormonales.doc)
5. E. Primo Yúfera, J.M. Carrasco Dorrien, “*Química Agrícola II: Plaguicidas y fitorreguladores*”, Ed. Alambra, 1986, Madrid, cap. 1 y 13
6. K.A. Hassal, “*The biochemistry and uses of pesticides*”, McMillan Press Ltd., 1990, Londres, cap. 1 y 2
7. FRAC Code List 2: Fungicide Resistance Action Committee
8. M. Danaher, H. De Ruyck, S.R.H. Crooks, G. Dowling, M. O’Keeffe, *J. Chromatogr. B*, **2007**, 845, 1
9. P.A. Friedmann, E.G. Platzer, *Biochim. Biophys. Acta*, **1978**, 544, 605
10. G.J. Russell, J.H. Gill, E. Lacey, *Biochem. Pharmacol.*, **1992**, 43, 1095
11. M. Cherify, M. Raveton, A. Piccicocchi, P. Ravanel, M. Tissut, *Plant Phys. Biochem.*, **2001**, 39, 665
12. <http://www.weedscience.org>
13. <http://www.epa.gov/oppfead1/safety/spanish/healthcare/handbook.html>
14. L.A. Rossi, “*Interim Reregistration Eligibility Decision for Atrazine*”, US-EPA, 2003, 1
15. H. Kalter, *Neurotox. Teratol.*, **2003**, 25, 131
16. “The problems of pesticides in Canada”, WWF Canada, **1999**, 1
17. F.Y. Bois, *Doss. Sci. Rev. Fran. des Lab.*, **2001**, 336, 59
18. <http://www.mcx.es/plaguicidas/>
19. Directiva 2006/11/CE de la Unión Europea
20. Directiva 2006/118/CE de la Unión Europea
21. Decisión 2455/2001/CE de la Unión Europea



22. 2006 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories, EPA 822-R-06-013
23. D. Barceló, *J. Chromatogr.*, **1993**, 643, 117
24. L.A. Rossi, *Reregistration Eligibility Decision for Prometryn* EPA (1996)
25. J.R. Dean, G. Wade, I.J. Barnabas, *J. Chromatogr. A*, **1996**, 733, 295
26. H. Sabik, R. Jeannot, B. Rondeau, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 885, 217
27. A.W. Rutherford, A.K. Liszkay, *Trends Biochem. Sci.*, **2001**, 26, 648
28. J.M. Soskic, *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **1997**, 394, 57
29. R.A. Larson, E.J. Weber, "Reaction Mechanisms in Environmental Organic Chemistry" CRC Press, 1994
30. E.L. Kruger, L. Somasundaram, R.S. Kanwar, J.R. Coats, *Environ. Tox. Chem.*, **1993**, 12, 1959
31. M. Fielding, D. Barceló, S. Helweg, L. Galassi, L. Tortensson, P. van Zoonen, R. Wolter, G. Angeletti, *Pesticides in ground and drinking water. Water pollution research report n° 27*. Comission of the European Communities, 1992
32. V.K. Gupta, I. Ali, *Int. J. Environ. Pollut.*, **2006**, 27, 204
33. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). 2003. Reseña Toxicológica de la Atrazina. Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública.
34. H.A. Young, P.K. Mills, D.G. Riordan, R.D. Cress, *J. Occup. Env. Med.*, **2005**, 47, 1148
35. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, 14th ed., M.J. O'Neil, P.E. Hekelman, C.B. Koch, K.J. Raman, Eds. (Merck & Co. Inc, Whitehouse Station, NJ, EEUU, 2006)
36. [www.planthogar.net](http://www.planthogar.net)
37. E. Lacey, J.H. Gill, *Acta Trop.*, **1994**, 56, 245
38. E.M. Bennet, C. Bryant, *Mol. Biochem. Parasitol.*, **1984**, 10, 335
39. R.K. Prichard, *Int. J. Parasitol.*, **1973**, 3, 409
40. G.T. Frahy, J.D. Smyth, J.G. Corbet, J. Savel, *Gen. Pharmacol.*, **1997**, 28, 273



41. E. Lacey, *Int. J. Parasitol.*, **1988**, 18, 885
42. P. Kohler, *Int. J. Parasitol.*, **2001**, 31, 336
43. P.H. Raven, G.B. Johnson, *Biology*, Timad Mirror/Cosby Collage Publishing, 1989, 2ª ed, p. 80
44. B. Nare, G. Lubega, P.K. Prichard, E. Georges, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 8575
45. D.W. Hollomon, J.A. Butters, H. Barrer, L. Hall, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1998**, 42, 2171
46. Q.A. McKellar, E.W. Scout, *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **1990**, 13, 233
47. M. Lapras, J.P. Deschanel, P. Delatour, J. Castello, H. Lombard, *Bull. Soc. Sci. Vet. Med. Comp.*, **1973**, 75, 53
48. P. Delatour, G. Lorgue, D. Courtot, M. Lapras, *Bull. Soc. Sci. Vet. Med. Comp.*, **1975**, 77, 197
49. P. Delatour, J. Debroye, G. Lorgue, D. Courtot, *Rec. Med. Vet.*, **1977**, 133, 639
50. J.A. Bogan, S.E. Marriner, in F. Back (ed.) *Albendazole in helminthiasis*, Royal Soc. Medicine, Internacional Congress Symposium Series no. 61, Londres, Royal Soc. Medicine, 1984, p. 13
51. European Agency for the Evaluation of Medical Products EMEA/MRL/268/97, 1997, Oxibenzazole summary report no. 2
52. R. Froyman, H. de Keyser, *Avian Dis.*, **1983**, 27, 48
53. J.P. Seiler, *Mutat. Res.*, **1975**, 32, 151
54. D.C. Main, D.E. Vas, *Aust. Vet. J.*, **1980**, 56, 237
55. P. Delatur, R. Parish, en A.G. Rico (ed.) *Drug Residues in Animals*, Academic Press Inc., Orlando, 1989, p. 175

### *3. REVISIÓN DE MÉTODOS*





### 3.1.- MÉTODOS EMPLEADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE TRIAZINAS

Las triazinas se encuentran entre los herbicidas más empleados en la actualidad tanto para la protección de los terrenos de cultivo como para la eliminación total de las malas hierbas en terrenos destinados a la construcción de carreteras, vías férreas o industrias. Este hecho, unido a su elevada persistencia en el medio ambiente ha provocado su acumulación en suelos y aguas ambientales, llegando incluso a contaminar las aguas de bebida. Por ello, se han establecido unos límites máximos de 0,1 µg/L en agua potable para cada uno de estos compuestos y sus productos de degradación y de 0,5 µg/L para el total de pesticidas.

Por otra parte, los límites máximos de residuo de las triazinas en los diferentes vegetales varían entre 0,05 y 0,1 mg/Kg, dependiendo del vegetal del que se trate. En la tabla 13 se resumen algunos de estos límites.

**TABLA 13: Límites máximos de residuos legislados para las triazinas en vegetales [1]**

Vegetal	LMR, mg/Kg
Cereales	0,05
Cucurbitáceas	0,05
Especias	0,1
Frutas frescas	0,05
Hortalizas	0,05
Leguminosas	0,05
Maíz	0,1
Patatas	0,05
Raíces, bulbos y tubérculos	0,05
Semillas oleaginosas	0,1
Otros cultivos	0,1





A continuación se recoge una descripción detallada de los métodos actualmente disponibles para llevar a cabo la determinación de triazinas en muestras de suelo, agua y vegetales. Existe una elevada variedad de métodos disponibles para llevar a cabo la determinación de triazinas en estas muestras. Por ello, se ha optado por clasificar estos métodos en función de la etapa del análisis: tratamiento de la muestra y determinación final del analito.

### **3.1.1. - TRATAMIENTO DE LA MUESTRA**

#### **Muestras vegetales**

El método elegido para llevar a cabo la extracción de los herbicidas presentes en una muestra depende tanto de la polaridad del compuesto a extraer como de la naturaleza de la matriz en la que se encuentre. Las triazinas se extraen habitualmente en un medio orgánico de polaridad intermedia por tratarse de compuestos medianamente polares, siendo los disolventes más utilizados el metanol [2], el acetonitrilo [3], el acetato de etilo [4], el cloroformo [5], el diclorometano [6] o la acetona [5].

Tradicionalmente, la extracción de triazinas en muestras vegetales se llevaba a cabo por procesos a reflujo [7], destilación por corriente de vapor [8] o agitación con disolventes [9]. Generalmente se requerían tiempos de varias horas para lograr una extracción cuantitativa de los compuestos, por lo que en la actualidad se han desarrollado nuevos procedimientos que, basándose en el empleo de ultrasonidos [10] o microondas [11], permiten disminuir considerablemente tanto el tiempo como el volumen de disolvente necesario para la extracción.

La baja selectividad de los procesos de extracción da lugar a la coextracción de una gran cantidad de especies que pueden interferir en la determinación posterior de los analitos. Este hecho, unido a la escasa selectividad de los detectores comúnmente empleados en la etapa de determinación final de estos compuestos, plantea la necesidad



de someter los extractos obtenidos a una etapa de limpieza previa al análisis, con el fin de poder aislar los analitos presentes en la muestra.

Hasta hace unos pocos años, la limpieza de los extractos obtenidos requería del empleo de varias etapas de extracción líquido-líquido [7,8,12] o extracción en fase sólida con adsorbentes poco selectivos, como intercambiadores iónicos [2], gel de sílice [6,8],  $C_{18}$  [4] o alúmina [9], entre otros. El empleo de la extracción líquido-líquido consumía un gran volumen de disolventes orgánicos tóxicos y se alargaba considerablemente el análisis. Por otra parte, los resultados obtenidos en la limpieza de muestras complejas eran bastante deficientes, debido a la co-extracción de componentes de la matriz.

En este sentido, Baranowska y col [5] llevaron a cabo una comparación de los procedimientos empleados en la limpieza de muestras de cerezas, fresas y cereales para la determinación de atrazina y simazina. Estos autores compararon los resultados obtenidos al limpiar la muestra mediante extracción en fase sólida empleando diferentes adsorbentes ( $C_{18}$ , poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB), intercambiadores iónicos, etc.) y extracción líquido-líquido, obteniendo mejores resultados mediante SPE en cartuchos de PS-DVB.

La introducción a finales del siglo XX de adsorbentes selectivos, como los anticuerpos o los polímeros generados por impresión molecular, ha permitido acortar los procesos de limpieza, ya que el reconocimiento molecular en el que se basan estos materiales permite eliminar la mayor parte de las especies interferentes en una única etapa de lavado. De este modo, se han aplicado con éxito a la limpieza de muestras de agua y extractos de muestras de suelos y/o sedimentos [13,14], pero existen muy pocos trabajos en los que se apliquen a la limpieza de muestras más complejas como los vegetales [15,16].

Chapuis y col. [17] demostraron que la limpieza del zumo de uva en un cartucho de PS-DVB (adsorbente no selectivo) conducía a la coextracción de numerosos interferentes que dificultaban el análisis de las triazinas. Estos autores recurrieron a la limpieza de las muestras empleando un polímero impreso con ametrín. Al ser un



material selectivo capaz de interaccionar con múltiples triazinas, este polímero se aplicó con éxito a la cuantificación de todas las triazinas presentes en la muestra.

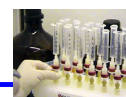
Por otro lado, en un trabajo previo publicado por nuestro grupo de investigación [18], se empleó un polímero impreso con propazina a la limpieza de muestras de agua, suelo y maíz. En el caso de maíz, los resultados no fueron del todo satisfactorios pues, si bien se conseguía la eliminación de la mayor parte de la matriz mediante la introducción de una etapa de lavado, la coelución de diferentes compuestos impedía la determinación de algunas de las triazinas evaluadas como la desetilatrizona.

### Muestras de agua

Como se ha mencionado en el apartado III.2.1.3., tanto la atrazina como la simazina se encuentran incluidas dentro de la lista de contaminantes prioritarios de la Unión Europea, lo que implica que, atendiendo a las directrices de la *Water Framework Directive*, debe hacerse un control periódico y sistemático del contenido tanto de estos compuestos como de sus productos de degradación en las distintas cuencas hidrográficas. La legislación vigente establece un contenido máximo de 0,1 µg/L para cada triazina y de 0,5 µg/L para la mezcla de pesticidas. Al ser una concentración tan baja, la inmensa mayoría de los métodos empleados en la determinación de triazinas en muestras de agua incluyen una etapa de preconcentración de las muestras, que generalmente se lleva a cabo mediante un proceso de extracción en fase sólida (SPE).

Los materiales adsorbentes empleados para la preconcentración de triazinas en muestras acuosas son de muy diversa naturaleza. Entre los más empleados se encuentran el C<sub>18</sub> [19-21], PS-DVB [22,23], intercambiadores iónicos [19,24], carbón activo [20], nanotubos de carbono [20] y materiales inorgánicos como arcillas [25] o tierra de diatomeas [26].

El volumen de ruptura de los distintos adsorbentes es uno de los parámetros clave a la hora de seleccionar el material más adecuado para la preconcentración de las



muestras. Así, por ejemplo, generalmente se obtienen mejores resultados preconcentrando las muestras sobre C18 para los analitos más hidrofóbicos, mientras que el PS-DVB, las resinas de intercambio iónico o el carbón activo proporcionan mejores resultados para la preconcentración de analitos polares [27,28]. Una forma de incrementar el volumen de ruptura es seleccionando un material con elevada área superficial específica, como por ejemplo LiChrolut [23,29,30], Oasis® [19,24,31], Styrosob-Macronet Hypersol [32] o Isolute ENV [33]. Asimismo, el empleo del denominado efecto salino (“salting-out effect”) ha demostrado ser eficiente en el incremento del volumen de ruptura en diferentes adsorbentes [34].

El principal inconveniente de estos adsorbentes convencionales para la preconcentración de muestras es su falta de selectividad, que conduce a la coextracción de numerosos compuestos que interfieren en la determinación de las triazinas. En los últimos años, la aparición de los polímeros generados por impresión molecular [23] o los inmunosorbentes [17] ha supuesto una excelente alternativa al empleo de este tipo de materiales, ya que permiten preconcentrar y limpiar simultáneamente las muestras.

En un trabajo reciente, Carabias y col. [23] emplearon un MIP para la preconcentración de triazinas y limpieza de muestras de agua de río. El polímero se sintetizó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente por Turiel y col. [18], sintetizado utilizando propazina como analito plantilla y ácido metacrílico como monómero. Estos polímeros son capaces de reconocer selectivamente tanto a las clorotriazinas (propazina, atrazina, desetilatrazina, desisopropilatrazina, simazina y terbutilazina) como a las tiometiltiazinas (prometrín y terbutrín) presentes en las muestras, pero no reconoce a las triazinas más polares como hidroxiatrazina, desetilhidroxiatrazina o desisopropilhidroxiatrazina.

El mayor inconveniente de este polímero es su bajo volumen de ruptura, lo que obliga a utilizarlo en combinación con polímeros comerciales (C<sub>18</sub> [18] y LiChrolut [23] respectivamente), para llevar a cabo una preconcentración eficaz de las triazinas y mejorar la interacción con las triazinas más polares. El trabajo desarrollado por Carabias y col. demostró que no existían diferencias significativas entre los resultados obtenidos al preconcentrar la muestra sobre LiChrolut y limpiarla posteriormente en el MIP o bien



limpiarla y preconcentrarla simultáneamente sobre una mezcla de ambos materiales. Los límites de detección obtenidos por los distintos métodos variaron entre 0,015 y 0,075  $\mu\text{g/l}$  para la preconcentración en  $\text{C}_{18}$  y posterior limpieza en MIP [18] y entre 0,03 y 0,1 ppb en el caso de la preconcentración en LiChrolut [23], con unas recuperaciones que oscilaban entre un 30 y un 103%.

Por último, la microextracción en fase sólida (SPME) ha surgido en los últimos años como una técnica alternativa a la SPE para la preconcentración de extractos acuosos [35]. La principal ventaja de esta técnica es que permite la desorción de los analitos retenidos en la fibra directamente en el inyector del cromatógrafo de gases, si bien en el caso de la determinación de las triazinas es necesario su derivatización, tal y como se describe más adelante.

### **Muestras de suelo**

En general, el 90% de las triazinas empleadas para la eliminación de las malas hierbas se adsorben en los suelos [36]. Su movilidad en el medio ambiente depende de multitud de factores, entre los que destacan la frecuencia e intensidad de las lluvias, la topografía del terreno y las características del suelo como pH, contenido en arcilla y materia orgánica [37]. Teniendo en cuenta que el tiempo de permanencia en el suelo abarca desde unos pocos días a varios años, resulta necesario disponer de métodos fiables que permitan llevar a cabo la determinación de las triazinas y sus productos de degradación en estas muestras.

Los métodos más empleados para la extracción de las triazinas de las muestras de suelo se basan en procedimientos de lixiviación en presencia de disolventes orgánicos tales como acetonitrilo [36], metanol [5], ciclohexano [38] o acetona [38]. El empleo de hornos microondas [17], baños de ultrasonidos [38.39] o sistemas de extracción acelerada [40] permite disminuir considerablemente el tiempo necesario para lograr la extracción cuantitativa de las triazinas presentes en las muestras de suelo.



La falta de selectividad de estos procedimientos de lixiviación generalmente conduce a la coextracción de numerosos componentes de la matriz que pueden interferir en la determinación posterior de las triazinas. Por ello, generalmente se debe incluir una etapa de limpieza con el objeto de eliminar en la mayor medida posible las especies interferentes. Solamente en el caso de muestras sencillas y siempre que se utilicen detectores selectivos como el espectrómetro de masas, es posible llevar a cabo la determinación directa de las triazinas, sin necesidad de ninguna etapa de limpieza previa de los extractos [39].

La técnica más empleada para llevar a cabo la limpieza de muestras de suelo para la determinación de triazinas es, sin lugar a dudas, la extracción en fase sólida. Si bien puede recurrirse al empleo de numerosas etapas de limpieza sobre adsorbentes clásicos tales como la alúmina [38] o las resinas de intercambio iónico [41], la mayor selectividad de otro tipo de materiales como MIPs o inmunosorbentes permite lograr una mayor limpieza de la muestra en una única etapa, con lo que se consigue acortar considerablemente el tiempo de análisis [17].

En un trabajo reciente, Baranowska y col. [5] evaluaron la posibilidad de emplear diferentes adsorbentes para la limpieza de muestras de suelo, con el objeto de analizar el contenido en atrazina y simazina presentes en el mismo. Dichos autores concluyeron que los mejores resultados se obtenían empleando una resina de intercambio iónico.

En otro estudio, Chapuis y col. [17] demostraron la necesidad de utilizar adsorbentes selectivos como los polímeros impresos o inmunosorbentes para la limpieza de muestras de suelo, dado que el empleo de materiales no selectivos como el PS-DVB conducía a la coextracción de numerosos interferentes. Los resultados obtenidos empleando tanto los polímeros impresos como el inmunosorbente fueron similares. No obstante, la línea base obtenida era considerablemente más estable en el caso de emplear los polímeros impresos, disminuyendo de esta forma el límite de detección. Estos autores también compararon dos polímeros impresos, empleando terbutilazina y ametrín como analitos plantilla. Este último polímero resultó ser el más adecuado,



proporcionando recuperaciones cuantitativas tanto para las tiometiltiazinas como para las clorotiazinas.

### **3.1.2. - DETERMINACIÓN FINAL**

#### **Inmunoensayos**

Un inmunoensayo se puede definir como un procedimiento analítico que integra una reacción antígeno-anticuerpo con un sistema de detección. Tradicionalmente, los inmunoensayos se han empleado en química clínica para la determinación de macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, etc. Estas moléculas de peso molecular elevado tienen carácter inmunológico, es decir, inducen una respuesta inmune en los seres vivos, pero las moléculas de bajo peso molecular, denominadas haptenos, no son capaces por sí solas de provocar dicha respuesta.

En las últimas décadas se ha ampliado el campo de aplicación de las técnicas inmunoquímicas al dotar a los haptenos de un carácter inmunogénico. Para ello, es necesario unir covalentemente el hapteno a una molécula grande denominada portadora (suele ser una proteína). El sistema hapteno-molécula portadora produce la reacción inmunológica deseada, induciendo la síntesis del anticuerpo específico. Los haptenos, si bien no son inmunogénicos, sí son capaces de reaccionar con su anticuerpo específico, es decir, tienen una función antigénica, por lo que pueden ser cuantificados mediante un inmunoensayo.

Estos procedimientos para producir anticuerpos específicos para moléculas de bajo peso molecular ha permitido la aplicación de los inmunoensayos a la determinación de pesticidas en muestras ambientales.

Existen numerosos formatos para realizar un inmunoensayo, pudiéndose clasificar en *homogéneos* y *heterogéneos*. Los primeros no requieren de una etapa de separación de la especie libre, antígeno o anticuerpo, del complejo antígeno-anticuerpo



(Ag-Ac). Este formato requiere que dicho complejo tenga una propiedad cuantificable diferente a la de las especies libres. Este tipo de inmunoensayos se ha aplicado con éxito a la determinación de triazinas en muestras de agua [42-44]. La detección se basa en la medida de cambios de la polarización de la radiación [44], en procesos de desactivación de la fluorescencia [45] o de transferencia de la energía [46].

Los formatos heterogéneos requieren la separación del complejo Ag-Ac de las especies libres, al no tener dicho complejo una propiedad cuantificable diferente. La separación se suele realizar mediante extracción en fase sólida sobre un soporte donde se ha inmovilizado el anticuerpo o el antígeno. Estos inmunoensayos requieren una etapa de lavado para eliminar la especie libre, pero generalmente proporcionan límites de detección menores que los proporcionados por los formatos homogéneos.

Otra denominación de los inmunoensayos es “*competitivo*” y “*no competitivo*”. En los primeros existe una competencia entre el antígeno marcado (Ag\*) y no marcado (Ag) por ocupar los sitios de unión del anticuerpo siempre que este se encuentre en defecto, detectándose el complejo Ag\*-Ac. A medida que aumenta la concentración de analito (Ag) en el medio, el antígeno marcado (Ag\*) se desplaza de los sitios de unión del anticuerpo y por lo tanto disminuye la concentración del complejo Ag\*-Ac, siendo esta disminución proporcional a la concentración del analito. En los formatos no competitivos se trabaja en exceso de reactivo (generalmente anticuerpo).

De los diferentes formatos de inmunoensayos, el más empleado para la determinación de pesticidas es el ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*). Un método ELISA es un inmunoensayo competitivo y heterogéneo donde el marcador es una enzima. Estos inmunoensayos se han aplicado con éxito a la determinación de triazinas en muestras de agua [47-49], de suelo [42,50,51] y vegetales [52,53], siendo los límites de detección extremadamente bajos. El principal inconveniente de estos inmunoensayos es el largo tiempo requerido para la etapa de incubación del analito con el anticuerpo y de la enzima con el sustrato, así como el elevado consumo de anticuerpo.





Actualmente, se están desarrollando diferentes formatos de inmunoensayos en flujo [54]. Para ello, se dispone de una superficie inmunoactiva, donde generalmente se inmoviliza el anticuerpo, y un sistema de transporte de fluidos que se encarga de transferir las disoluciones de reactivo y muestra hasta esta superficie. Sobre la superficie inmunoactiva tiene lugar la reacción inmunológica y, en los ensayos competitivos, actúa además eliminando el exceso de marcador, permitiendo cuantificar la relación  $Ag^*-Ac/Ag-Ac$ . Estos métodos se han aplicado con éxito a la determinación de triazinas en muestras acuosas [54-57] y de suelo [58].

### *Cromatografía de gases (GC)*

La cromatografía de gases ha sido tradicionalmente la técnica más empleada para la determinación de pesticidas, debido a su elevada eficacia de separación, la rapidez del análisis y la alta sensibilidad de los detectores existentes. Esta técnica se aplica generalmente a la determinación simultánea de pesticidas de diferentes familias en muestras de suelo y aguas naturales y/o de bebida [40].

Debido a la presencia de grupos hidroxilo y amino, las triazinas son en general compuestos poco volátiles, por lo que su separación y determinación por cromatografía de gases suele requerir un proceso de derivatización previo. El procedimiento de derivatización más empleado se basa en la reacción de azotación de los grupos amino con diazometano [59].

Entre los detectores más empleados en cromatografía de gases para la determinación de triazinas se encuentran la espectrometría de masas [21,60-63], el detector de nitrógeno-fósforo [39,64], el detector de captura electrónica [38,65] y el detector de ionización de llama [66].

Actualmente, se tiende a acoplar el proceso de limpieza y preconcentración de las muestras con la determinación mediante cromatografía de gases. De esta forma, el acoplamiento en línea de la extracción en fase sólida y el cromatógrafo permite



disminuir considerablemente el tiempo de análisis al eliminar la etapa de evaporación del disolvente, a la vez que se incrementa la sensibilidad de la técnica, ya que toda la muestra se introduce directamente en el cromatógrafo de gases [66]. Un parámetro crucial que debe controlarse cuidadosamente cuando se acoplan los procesos de SPE y GC es el tiempo de evaporación del disolvente, con el fin de eliminar las trazas de agua presentes en el mismo.

Por otro lado, el empleo de la microextracción en fase sólida es una excelente alternativa a la extracción en fase sólida para la determinación de analitos mediante cromatografía de gases. El diseño de las fibras de SPME permite la desorción de los analitos directamente en el inyector del cromatógrafo. En el caso de las triazinas, la desorción térmica se lleva a cabo a temperaturas comprendidas entre 240 y 280°C durante un intervalo de tiempo de 2-5 minutos [60,67]

### *Cromatografía de líquidos (HPLC)*

El empleo de la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) para la determinación de pesticidas se ha incrementado considerablemente en las últimas décadas debido tanto al desarrollo de interfases que permiten su acoplamiento a la espectrometría de masas como a la posibilidad de determinar compuestos poco volátiles sin necesidad de someterlos a un proceso de derivatización.

La modalidad más empleada para la separación cromatográfica de las triazinas es la fase inversa, donde generalmente se emplean columnas rellenas de  $C_{18}$  y una fase móvil constituida por mezclas de agua, acetonitrilo y/o metanol. Debido a las diferencias de polaridad de las distintas triazinas, el modo de elución más habitualmente empleado es el de gradiente.

El HPLC se ha empleado ampliamente en la determinación de triazinas en agua [22,26,68], suelos [5,10,17,41] y vegetales [5,69,70]. Generalmente las muestras deben someterse a un proceso previo de limpieza y/o preconcentración con el objeto de



eliminar las posibles interferencias y aumentar la sensibilidad de la técnica. Este proceso puede llevarse a cabo tanto en línea como fuera de línea, si bien el empleo de una precolumna para la limpieza y preconcentración en línea de las muestras aumenta la sensibilidad de la detección y facilita la automatización del método. Entre los materiales más empleados como adsorbentes en estas precolumnas para la determinación de triazinas se encuentran el  $C_{18}$ , PS-DVB, inmunosorbentes, resinas de intercambio iónico o polímeros de impresión molecular [71-75].

Las triazinas se detectan habitualmente mediante espectroscopía UV a una longitud de onda de 220-230 nm. La falta de selectividad de estos detectores plantea la necesidad de emplear un sistema de detección alternativo como método de confirmación. En el caso de las triazinas, esta confirmación se puede llevar a cabo por espectroscopia infrarroja [76] o, más habitualmente, mediante el acoplamiento del HPLC a un espectrómetro de masas [77].

### **Electroforesis capilar**

El desarrollo de la cromatografía electrocinética micelar (MEKC) en 1984 por Terabe y col. [78] permitió extender el campo de aplicación de la electroforesis capilar a la determinación de compuestos neutros, al basar su separación en la diferente interacción con las micelas presentes en la fase móvil.

Uno de los primeros trabajos basados en el empleo de esta técnica para la determinación de triazinas es el de Desiderio y col [79], los cuales pusieron a punto un método para la determinación de atrazina y simazina en agua de río. Este método fue posteriormente aplicado por Turiel y col. [18] para la determinación de atrazina, simazina, desisopropilatrazina, desetilatrazina, propazina y prometrín en muestras de aguas naturales, suelos y maíz.

La electrocromatografía capilar (CEC) también se ha aplicado a la separación de triazinas, aunque en menor extensión que la MEKC. Esta técnica, que combina la



electroforesis capilar con la cromatografía de líquidos, emplea capilares rellenos con  $C_{18}$  u otros adsorbentes y fases móviles con un elevado contenido en disolvente orgánico [80,81]. En la electrocromatografía capilar, la fase móvil se hace pasar a través de la fase estacionara por la acción de un campo eléctrico aplicado entre los dos electrodos situados en los extremos del capilar. Esta técnica no se ha aplicado por el momento a la determinación de triazinas en muestras reales.

A pesar del desarrollo de interfases para el acoplamiento entre la electroforesis capilar y el espectrómetro de masas, la técnica de detección más empleada hoy en día para la determinación de las triazinas tras la separación electroforética sigue siendo la espectrofotometría UV.

### **Sensores**

Los sensores desarrollados para la determinación de triazinas se basan en el empleo de biomoléculas o receptores moleculares, ya que son considerablemente más selectivos que los sensores basados en procesos físicos o químicos. De todos ellos, los más empleados son los inmunosensores, tanto ópticos como electroquímicos.

Los inmunosensores ópticos más empleados para la determinación de triazinas son los de onda evanescente [82] y resonancia de plasmones superficiales [83]. Por otro lado, los inmunosensores electroquímicos se basan en la detección amperométrica de los productos formados como consecuencia de una reacción enzimática en un proceso ELISA [84]. En general, todos estos sensores se caracterizan por los bajos límites de detección obtenidos, del orden de ng/L, que permiten la determinación de triazinas en muestras acuosas a los niveles requeridos por la legislación vigente.

Uno de estos trabajos es el realizado por Hipólito-Moreno y col. [85], los cuales pusieron a punto un método para la determinación de atrazina en muestras de maíz mediante un sistema FIA. Dicha determinación se basa en el efecto inhibidor que ejerce la atrazina sobre la enzima tirosinasa, responsable de la oxidación de catecol. El método



### **REVISIÓN DE MÉTODOS:** *Determinación de triazinas*

---



desarrollado permite obtener recuperaciones de un 98%, siendo el límite de detección de 0,04 mg/kg y el de cuantificación de 0,15 mg/kg. Es importante destacar que este último valor es superior al límite de residuo de atrazina en maíz en vigor desde el año 2004 (0,10 mg/kg) [1], lo que impide el empleo de este método para llevar a cabo la cuantificación de atrazina en muestras de maíz en la actualidad.

Además, se han descrito otro tipo de sensores basados en la medida de la alteración que producen las triazinas sobre las reacciones bioquímicas que tienen lugar en los seres vivos. Así, por ejemplo, se han desarrollado sensores basados en la inhibición de la fotosíntesis [86], en la perturbación electrostática sobre las membranas lipídicas [87] o en la inducción de la formación de mRNA en las células de *S. cerevisiae* [88].



### 3.2. - MÉTODOS EMPLEADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE BENZIMIDAZOLES

Como se ha mencionado en el apartado III.2.2.3., los benzimidazoles pueden utilizarse tanto en el tratamiento de enfermedades originadas por la presencia de parásitos en animales como para el control del crecimiento de hongos durante el almacenamiento de frutas y vegetales. Esta aplicación tan extensa ha hecho necesario establecer su control en carnes, leche, frutas y vegetales. A modo de ejemplo, en la tabla 14 se recogen los valores legislados para el límite máximo de residuos (MRL) de tiabendazol en distintas muestras.

**TABLA 14: Límites máximos de residuos legislados para tiabendazol en alimentos [89]**

Muestras	LMR, mg/Kg
Aguacate	15
Avellanas	0,10
Castañas	0,10
Cítricos	5
Manzana	5
Nueces	0,10
Papaya	10
Patata	15
Pera	5
Plátano	5
Setas	10
Otros cultivos	0,05
Carne	0,1
Hígado	0,1
Leche	0,1
Riñón	0,1



Por otra parte y, dado que el empleo abusivo de este tipo de compuestos ha conducido a su acumulación en las aguas superficiales, también se ha establecido un contenido máximo en agua que oscila entre 0,1 y 1  $\mu\text{g/L}$  en función del tipo de compuesto del que se trate [90].

### **3.2.1. - TRATAMIENTO DE LA MUESTRA**

En general, los métodos empleados para la extracción de benzimidazoles en las muestras de alimentos son los mismos que los empleados en la extracción de cualquier compuesto orgánico, por lo que se emplean disolventes orgánicos polares puros como acetonitrilo, metanol o dimetilsulfóxido o mezclados con agua o disoluciones ácidas [91]. La extracción Soxhlet que tradicionalmente se empleaba durante tiempos que oscilaban entre 8 y 24 horas [91,92] está siendo sustituida por técnicas de extracción más eficaces como la extracción en microondas [92-95], baño de ultrasonidos [96] o asistida con disolventes [97-99] que permiten acortar considerablemente el tiempo de esta etapa.

La elevada solubilidad de los benzimidazoles en medio ácido plantea la necesidad de controlar el pH de las muestras durante la extracción de los benzimidazoles. Así, por ejemplo, se ha demostrado que la falta de control del pH disminuye considerablemente la reproducibilidad de la determinación del contenido de benzimidazoles en muestras de cítricos [100]

En la mayor parte de los casos, la falta de selectividad de este proceso de extracción conduce a la coelución de numerosas especies que pueden interferir posteriormente en la determinación de los benzimidazoles. Por lo tanto, generalmente se requiere de la realización de una o más etapas de limpieza de los extractos, con objeto de eliminar el mayor número posible de interferencias. Los procedimientos más empleados para la limpieza y preconcentración de muestras para la determinación de benzimidazoles se basan en procesos de extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida.



La optimización de estos procesos presenta una problemática adicional en el caso de los benzimidazoles, derivada de la diferencia en el valor de los pKa (tabla 15). En este sentido, encontrar un intervalo de pH adecuado para la extracción conjunta de los benzimidazoles es un proceso extraordinariamente complejo ya que es necesario que todos ellos se encuentren en estado neutro.

**TABLA 15: Valores de pKa de los benzimidazoles más empleados  
y sus principales metabolitos [91]**

Benzimidazol	pKa <sub>1</sub>	pKa <sub>2</sub>
Albendazol (ABZ)	5,54	13,11
ABZ-SO	5,69	13,25
ABZ-SO <sub>2</sub>	3,50	11,20
ABZ-NH <sub>2</sub> -SO <sub>2</sub>	5,98	13,30
Fenbendazol (FBZ)	5,12	12,72
Oxfendazol	4,13	11,79
FBZ-SO <sub>2</sub>	3,41	11,12
Flubendazol (FLU)	4,10	11,76
FLU-HMET	6,58	13,87
FLU-RMET	5,57	13,14
Mebendazol (MBZ)	4,13	11,79
MBZ-OH	5,60	13,16
MBZ-NH <sub>2</sub>	6,61	13,89
Oxibendazol	6,26	13,78
Tiabendazol (TBZ)	5,22	12,83
5-OH-TBZ	7,65	5,46

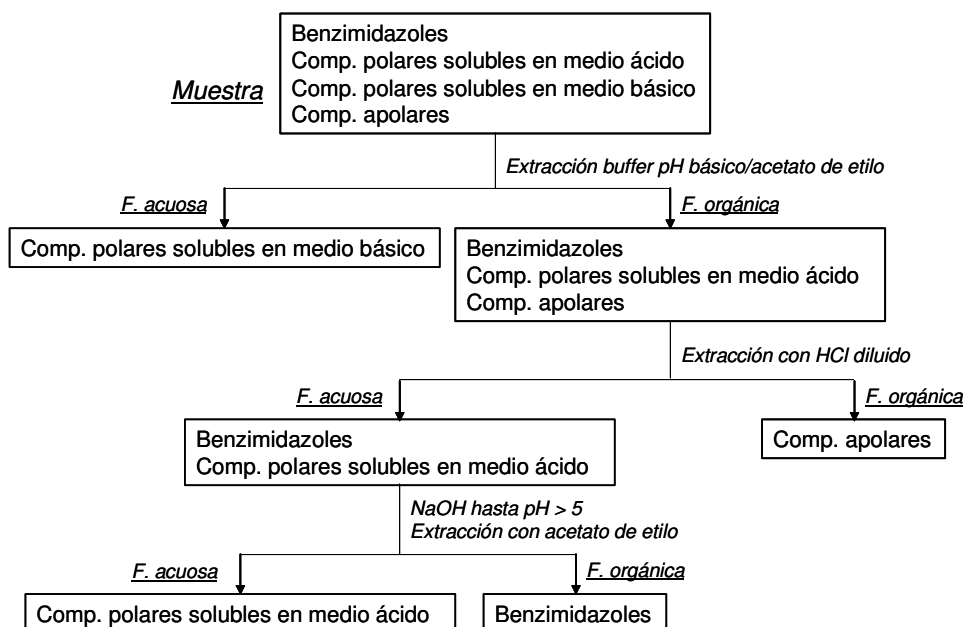




**TABLA 15 (continuación): Valores de pKa de los benzimidazoles más empleados y sus principales metabolitos [91]**

Benzimidazol	pKa <sub>1</sub>	pKa <sub>2</sub>
Triclabendazol (TCB)	5,31	12,91
TCB-SO	1,82	10,95
TCB-SO <sub>2</sub>	1,82	9,99
Cambendazol	5,44	13,04
Carbendazim	5,52	13,09

Es por ello que en algunos casos, los procedimientos empleados pueden ser bastante complejos. A modo de ejemplo, en la figura 18 se muestra esquemáticamente el procedimiento experimental necesario para aislar los benzimidazoles presentes en una muestra de agua [101].



**FIGURA 18: Procedimiento experimental empleado en la purificación de muestras mediante extracción líquido-líquido para la determinación de benzimidazoles**



### Muestras de agua

Jeannot y col. [101] llevaron a cabo la determinación de carbendazim en muestras de agua de río en presencia de una gran variedad de pesticidas de diferentes familias. Para ello, las muestras se preconcentraron mediante extracción líquido-líquido o mediante extracción en fase sólida empleando tanto cartuchos de  $C_{18}$  como carbón activo. La determinación de los diferentes pesticidas se llevó a cabo mediante HPLC, empleando detección ultravioleta o espectrometría de masas. El límite de detección obtenido mediante el procedimiento óptimo (preconcentración en cartucho de  $C_{18}$  y detección por espectrometría de masas) fue de 6 ng/L.

Posteriormente, otros autores [102,103] se han basado en el trabajo de Jeannot para determinar carbendazim, fuberidazol, tiabendazol y benomil en aguas superficiales.

Un procedimiento alternativo emplea PS-DVB como adsorbente para la extracción de benzimidazoles en aguas. Así, por ejemplo, Hogendoorn y col. [104] utilizaron cartuchos de PS-DVB para preconcentrar aguas superficiales, con el objeto de determinar carbendazim. La recuperación obtenida oscilaba entre un 71 y un 101%, dependiendo del tipo de muestra, siendo el límite de detección de 0,1  $\mu\text{g/L}$ .

Por último, la introducción en los últimos años de la extracción micelar ha permitido incrementar considerablemente los factores de preconcentración, disminuyendo por lo tanto el límite de detección. Esta técnica se basa en el empleo de surfactantes adsorbidos sobre diferentes materiales (generalmente, alúmina). Así por ejemplo, se han utilizado oligoetilenglicol monoalquiléter (Genapol X-080) o polioxietilenaureil éster (POLE) para preconcentrar carbendazim, benomil, tiabendazol y fuberidazol presentes en aguas superficiales. Los límites de detección oscilan entre 0,01 y 7  $\mu\text{g/L}$  [105]. El empleo de SDS como surfactante permite disminuir aún más los límites de detección, hasta 4 ng/L [106].



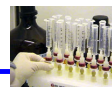
### Muestras vegetales

Pease y col. [107,108] fueron los primeros en poner a punto un método para la determinación de benzimidazoles, en concreto benomil, en muestras vegetales aplicando la extracción líquido-líquido como método de limpieza de las muestras. La extracción se realiza y posteriormente se derivativa. En este sentido, un proceso de hidrólisis ácida de los extractos transforma el benomil en carbendazim, que posteriormente se hidroliza a 2-aminobenzimidazol en medio básico. Una vez derivatizada de esta forma la muestra, se somete a un proceso de purificación mediante extracción líquido-líquido empleando mezclas de agua y acetato de etilo, tal y como se muestra en el esquema de la figura 18, determinándose finalmente el 2-aminobenzimidazol por fluorescencia, con una recuperación del 76%.

El procedimiento desarrollado por Pease se ha aplicado con éxito a la determinación de benomil, carbendazim y 2-aminobenzimidazol en muestras de suelo y vegetales [109,110]. Tjan y Jansen [111] variaron el procedimiento inicial empleando una disolución de HCl 0,1 M como extractante. El empleo de este medio ácido permitió incrementar las recuperaciones obtenidas hasta un 90%.

Además de la mezcla de agua y acetato de etilo descrita anteriormente, se han descrito otros procedimientos para la purificación de los extractos de muestras vegetales basados en el empleo mezclas de etanol/diclorometano [112], hexano/acetato de etilo [113] o de una disolución saturada de NaCl/diclorometano [114], entre otros. En general, estos métodos pretenden extender el análisis a determinados benzimidazoles que, como el tiofanatometil, no pueden analizarse empleando mezclas de agua y acetato de etilo, debido a la baja solubilidad de este compuesto en acetato de etilo.

En este sentido, Farrow y col. [115] variaron el procedimiento descrito por Pease, al sustituir el empleo del acetato de etilo por cloroformo. En este caso, se prepararon extractos de muestras de cítricos mediante reflujo en presencia de una disolución de HCl 2 M. Dichos extractos se purificaron posteriormente mediante diversas etapas de extracción líquido-líquido con mezclas de agua y cloroformo,

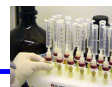


permitiendo analizar tiofanatometil con una recuperación del 32%. Aunque la recuperación fue muy baja, es importante destacar que éste fue el primer procedimiento que permitió separar el tiofanatometil de los numerosos compuestos que interferían en su análisis. De esta forma, fue posible analizar directamente este compuesto, sin necesidad de transformarlo previamente en carbendazim.

La saturación de la fase acuosa con una sal como cloruro sódico permite incrementar aún más la recuperación obtenida para los diferentes benzimidazoles, debido al efecto “*salting out*”. Así, por ejemplo, se han alcanzado recuperaciones de hasta un 63% para la determinación de tiofanatometil en cítricos [116] o superiores al 90% para la determinación de benomil, carbendazim y tiabendazol en peras y manzanas [117] mediante este sencillo procedimiento.

La extracción en fase sólida también ha sido muy empleada para la purificación de extractos de muestras vegetales. Uno de los primeros ejemplos fue el trabajo de Aharonson y col. [118] para la determinación de benzimidazoles, en concreto de benomil, carbendazim y tiabendazol en muestras vegetales. Los extractos de las muestras se limpiaron mediante tres procesos de extracción en fase sólida consecutivos, empleando cartuchos rellenos con óxido de magnesio, celita y alúmina, y la determinación final se llevó a cabo por medidas de fluorescencia. Las recuperaciones estuvieron comprendidas entre un 60 y un 70%. El empleo de adsorbentes comerciales como el polietileno (Extrelut<sup>TM</sup>) y la optimización del pH tanto de las muestras de cítricos como de los extractos permitió incrementar las recuperaciones hasta un 97% [119].

Por otro lado, el empleo de materiales de intercambio iónico como adsorbentes en procesos de extracción en fase sólida, tanto de manera aislada como en combinación con adsorbentes poliméricos, ha supuesto una considerable mejora en la limpieza de muestras vegetales para la determinación de benzimidazoles. En este sentido, son numerosos los procedimientos basados en la purificación de los extractos de diferentes muestras de fruta tales como cítricos, plátano, manzana y uvas mediante procesos de intercambio iónico.



Así, por ejemplo, Arenas y Johnson [120] desarrollaron un método para la determinación de tiabendazol en muestras de plátano. El tiabendazol presente en las muestras se extrae en acetato de etilo y, después de cargarlo sobre un cartucho de intercambio catiónico (SCX), se eluye con una disolución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1M en acetonitrilo. La determinación final se lleva a cabo mediante HPLC con detección fluorescente con una recuperación del 94%. Otros investigadores [121] aplicaron este procedimiento de limpieza a la determinación de benzimidazoles en muestras de cítricos, si bien para extraer cuantitativamente los benzimidazoles fue necesario neutralizar previamente las muestras.

Young y col. [122,123] pusieron a punto un método para la determinación de tiabendazol y carbendazim en muestras de zumo de naranja, manzana y uva, para lo cual emplearon Oasis® como adsorbente. Dicho material presenta un modo mixto de funcionamiento, actuando como resina de intercambio catiónico fuerte y como adsorbente de fase inversa. Dichos autores evaluaron la posibilidad de utilizar estos cartuchos con ambos mecanismos. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizaba de forma secuencial, primero como fase inversa y posteriormente como intercambiador catiónico, al eliminar de esta forma los polifenoles presentes en las muestras. La determinación del tiabendazol y el carbendazim se llevó a cabo por LC-MS, obteniéndose recuperaciones comprendidas entre un 74 y un 90%.

### *Muestras de carne y productos lácteos*

El método desarrollado por Pease [107] también ha sido empleado más recientemente para la purificación de extractos de muestras de hígado y músculo para llevar a cabo la determinación de fenbendazol y oxfendazol [124]. En este caso, la extracción de los benzimidazoles desde las muestras de carne se realiza mediante agitación con éter de petróleo y posterior extracción con un tampón de fosfato. Las recuperaciones obtenidas oscilaron entre un 70 y un 80%.



La mezcla de disoluciones acuosas tamponadas y acetato de etilo también se ha empleado con éxito en la purificación de muestras de leche y queso [125-127]. Así, por ejemplo, Fletouris y col. pusieron a punto un método para la determinación de 10 benzimidazoles en muestras de leche [126], basado en la purificación de los extractos mediante extracción líquido-líquido en presencia de acetato de etilo y una disolución tamponada a pH 10. Las recuperaciones obtenidas fueron superiores al 80%, excepto en el caso del fenbendazol, para el que se obtuvo una recuperación del 60%.

Danaher y col. [128] evaluaron diferentes métodos de purificación de muestras para la determinación de una mezcla de benzimidazoles en muestras de hígado de pollo, vaca y cerdo, tras su extracción con fluidos supercríticos. Entre los procedimientos de limpieza evaluados se encontraban el empleo de cartuchos de C<sub>18</sub>, Oasis® o intercambiadores catiónicos para extracción en fase sólida y extracción líquido-líquido con mezclas de hexano/etanol(HCl) o hexano/metanol(HCl). Dichos autores observaron que la limpieza mediante extracción en fase sólida con cartuchos de C<sub>18</sub> o Oasis® y la extracción líquido-líquido conducía a la coextracción de una gran cantidad de interferentes y a recuperaciones del orden de 55-65%. Sin embargo, la limpieza del extracto mediante el intercambiador catiónico fue muy satisfactoria y permitió llevar a cabo la cuantificación de los benzimidazoles mediante HPLC-UV, con recuperaciones que oscilaban entre un 33% para el mebendazol y un 93% para el flubendazol.

Moreno y col [129] aplicaron un método de extracción en fase sólida para la determinación de albendazol, fenbendazol y sus metabolitos en muestras de leche. Este método emplea cartuchos de C<sub>18</sub> para la purificación de las muestras, previamente desproteinizadas con acetonitrilo. La detección de estos compuestos se llevó a cabo mediante HPLC-UV con recuperaciones que oscilaban entre el 77 y el 97%.

Recientemente, de Prada y col. [130] emplearon un polímero impreso con fenbendazol como método de purificación de los extractos de hígado de ternera para la determinación de dicho compuesto mediante voltamperometría de onda cuadrada, obteniendo recuperaciones de un 95%. Aunque el procedimiento desarrollado no se



aplicó a la determinación de otros benzimidazoles, los autores demostraron la presencia de reactividad cruzada con albendazol y mebendazol.

La mayor complejidad de las muestras de carne hace que muchas veces sea necesario recurrir al empleo de diversas etapas de purificación de los extractos, de forma que generalmente se emplea primero una etapa de extracción líquido-líquido, seguido de una posterior limpieza de los extractos mediante extracción en fase sólida. En este caso, la mezcla de disolventes más empleada en los procesos de extracción líquido-líquido es hexano y etanol en presencia de HCl [91]. Entre los adsorbentes empleados en el proceso de extracción en fase sólida se encuentran C<sub>2</sub> [131], Oasis® [132], PS-DVB [133] y C<sub>18</sub> [134].

### **3.2.2. - DETERMINACIÓN FINAL**

#### **Inmunoensayos**

Los inmunoensayos son técnicas de determinación muy sensibles y selectivas para la cuantificación de los benzimidazoles presentes en una muestra. La selectividad de estas técnicas ha permitido en muchos casos el análisis de muestras de leche, suero y plasma sin necesidad de someter las muestras a una etapa previa de limpieza, siendo posible su medida directa o tras una simple dilución de las mismas.

Los primeros inmunoensayos que se aplicaron a la cuantificación de benzimidazoles fueron los radioinmunoensayos (RIA), que empleaban radionúclidos para el marcaje. Así, por ejemplo, los RIA se han empleado para determinar oxfendazol en muestras de plasma [135] y tejidos grasos de oveja [136] o para el análisis de benomil en muestras vegetales [137], tras su transformación a carbendazim mediante hidrólisis ácida.

Actualmente, los inmunoensayos más empleados para la determinación de los benzimidazoles se basan en la realización de inmunoensayos competitivos de tipo



ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*). En este sentido, se han descrito trabajos basados en el empleo de anticuerpos policlonales para la determinación de benomil y tiabendazol en muestras vegetales [138] o para la determinación de diferentes benzimidazoles en muestras de hígado de ternera [139]

El desarrollo de anticuerpos monoclonales aumenta aún más la selectividad de los métodos inmunoquímicos. Así, por ejemplo, Brandon y col [140] desarrollaron dos anticuerpos monoclonales, anti-tiabendazol y anti-5-hidroxitabendazol para determinar ambos compuestos en muestras de hígado de ternera. La comparación del funcionamiento de los dos anticuerpos demostró que el anticuerpo preparado con tiabendazol era considerablemente más selectivo que el que se preparó en presencia de 5-hidroxitabendazol, que presentaba reactividad cruzada para tiabendazol, TBZ-NH<sub>2</sub> y cambendazol. Estos mismos autores [141] emplearon el anticuerpo obtenido para tiabendazol para determinar este compuesto en muestras de fruta, vegetales y zumos. La elevada selectividad del proceso permitió llevar a cabo la determinación de tiabendazol directamente en los zumos.

La utilización de un anticuerpo monoclonal para albendazol se ha aplicado con éxito a la determinación de albendazol, fenbendazol, oxibendazol, mebendazol, flubendazol y carbendazim en muestras de hígado de ternera [142]. Por otro lado, el empleo de anticuerpos monoclonales para flubendazol permite su determinación en muestras de leche [143].

### *Cromatografía de gases (GC)*

La baja volatilidad de la mayor parte de los benzimidazoles complica considerablemente su determinación mediante esta técnica. En este sentido, generalmente es necesario derivatizar los benzimidazoles presentes en la muestra, con el objeto de aumentar su volatilidad y obtener una señal analítica adecuada para la correcta identificación del fungicida. Entre los procesos de derivatización más empleados se

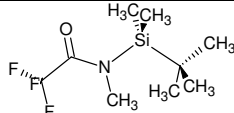
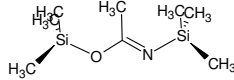
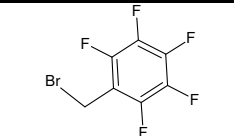
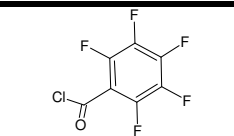




encuentran, por ejemplo, la alquilación o acilación de los restos amino o hidroxilo o la hidrólisis del carbamato y posterior alquilación/acilación del grupo amino generado.

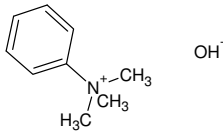
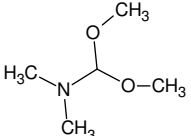
Los únicos benzimidazoles que, por ser considerablemente más volátiles que el resto, pueden inyectarse directamente en el cromatógrafo de gases sin necesidad de una derivatización previa son el tiabendazol y el triclabendazol. En la tabla 16 se muestran algunos de los procedimientos empleados para derivatizar los benzimidazoles presentes en una muestra.

**TABLA 16: Procedimientos empleados en la derivatización de benzimidazoles para su determinación mediante cromatografía de gases**

Reactivo	Benzimidazoles	Condiciones	Ref.
 <chem>CC(F)(F)C(F)(F)N(C)Si(C)(C)C</chem>	Carbendazim, tiabendazol, fenbendazol, mebendazol	110°C, 2 h	[131,144, 145]
 <chem>CC(C)(C)Si(C)(C)OC(=O)C(=O)N(C)Si(C)(C)C</chem> Piridina	Cambendazol, tiabendazol	60°C, 30 min	[146-148]
 <chem>Brc1cc(F)c(F)cc1</chem> $K_2CO_3$	Tiabendazol, triclabendazol, albendazol, fenbendazol, oxfendazol, mebendazol, flubendazol, oxibendazol, carbendazim	100°C, 3 h	[111,149, 150]
 <chem>Clc1cc(F)c(F)cc1</chem> $Na_2CO_3$	Tiabendazol	120°C, 30 min	[100,149, 151]
$CH_3I$	Tiabendazol, triclabendazol, albendazol, fenbendazol, oxfendazol, mebendazol, flubendazol, oxibendazol	60°C, 30 min	[149]



**TABLA 16 (continuación): Procedimientos empleados en la derivatización de benzimidazoles para su determinación mediante cromatografía de gases**

Reactivo	Benzimidazoles	Condiciones	Ref.
 Metanol	Cambendazol, tiabendazol	Butilación en columna	[131,152,153]
	Tiabendazol	120°C, 40 min	[154]

Las técnicas de detección más empleadas para la determinación de benzimidazoles por cromatografía de gases son la espectrometría de masas, la captura electrónica y el detector de nitrógeno/fósforo.

La cromatografía de gases se ha aplicado fundamentalmente a la determinación de benzimidazoles en muestras vegetales. Así, se han determinado residuos de tiabendazol o sus metabolitos en frutas [100,113,151,154], benomil en vegetales [110] o carbendazim y benomil (tras su hidrólisis a carbendazim) en frutas [111,150]. Además, la cromatografía de gases se ha aplicado a la cuantificación de metabolitos de cambendazol en muestras de orina [146,148] o a la confirmación de la presencia de numerosos benzimidazoles en muestras de diferentes tejidos animales [131,149,155].

### Cromatografía de líquidos (HPLC)

La cromatografía de líquidos es la técnica más empleada para la separación y cuantificación de los benzimidazoles presentes en una muestra. No obstante, debido a las diferencias de las propiedades físico-químicas de estos compuestos, su separación puede en ocasiones resultar complicada.



Los detectores más empleados para la determinación de benzimidazoles son la espectrofotometría UV y la espectrometría de masas. Además, en el caso de algunos benzimidazoles (albendazol, cambendazol, fenbendazol, tiabendazol y triclabendazol o cualquiera de sus metabolitos) puede aplicarse la detección por fluorescencia [91]. Por último, existen algunos trabajos [156,157] en los que se describe el empleo de técnicas electroquímicas para la determinación de los benzimidazoles presentes en una muestra.

El mecanismo más habitual empleado para la separación de los benzimidazoles es el de fase inversa, empleándose columnas de  $C_8$  o  $C_{18}$  como fases estacionarias y mezclas de agua o disoluciones tamponadas con disolventes orgánicos polares (acetonitrilo o metanol). Aunque se han descrito trabajos con elución isocrática [158-160], lo más habitual es emplear una elución en gradiente con dos o más disolventes [128,161-163].

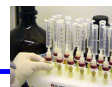
Además, se han puesto a punto métodos de separación de benzimidazoles basados en otro tipo de interacciones con la fase estacionaria, tales como:

- *Cromatografía en fase normal:* Emplea sílica como fase estacionaria y mezclas de acetonitrilo, ácido fórmico y una disolución acuosa saturada con cloroformo como fase móvil. Este procedimiento se ha aplicado, entre otros, a la determinación de mebendazol en plasma [164] o a la separación de oxfendazol del triclabendazol y sus metabolitos [165].
- *Cromatografía de intercambio catiónico:* Se basa en el empleo de una resina de intercambio catiónico fuerte, la cual es capaz de retener los benzimidazoles en medio ácido. Se ha aplicado a la determinación de benomil en muestras vegetales y de suelo [109] y al análisis de tiabendazol y 5-hidroxitiabendazol en muestras de leche [166].
- *Cromatografía en fase inversa con formación de pares iónicos:* Para la separación de los benzimidazoles empleando  $C_{18}$  como fase estacionaria, los formadores de pares iónicos añadidos a la fase móvil son octano sulfonato o



tetrabutylamonio [167]. La cromatografía de pares iónicos se ha empleado en la separación de albendazol y sus productos de degradación [167], fenbendazol y oxfendazol [168], en la separación de albendazol, febendazol, oxibendazol, levamisol y tiabendazol [127] y para la determinación de los metabolitos del triclabendazol en muestras de plasma y orina [169].

Por otro lado, el empleo de polímeros generados por impresión molecular como fase estacionaria en HPLC elimina la etapa de limpieza de la muestra, acortando considerablemente el tiempo de análisis. Así, por ejemplo, se ha empleado un polímero impreso con tiabendazol para la determinación de este compuesto en muestras de frutas y vegetales [170].



### 3.3. - BIBLIOGRAFÍA

1. <http://www.mcx.es/plaguicidas/>
2. J.R. Pardue, *J. AOAC*, **1985**, 78, 856
3. M. Battista, A. Dicorcia, M. Marchetti, *Anal. Chem.*, **1989**, 61, 935
4. C. Wittmann, B. Hock, *J. Agric. Food Chem.*, **1993**, 41, 1421
5. J.S. Thomton, C.W. Stanely, *J. Agric. Food. Chem.*, **1977**, 25,380
6. H. Roseboom, H.A. Herhold, *J. Chromatogr.*, **1980**, 202, 431
7. I. Baranowska, H. Barchanska, A. Pyrsz, *Chemosphere*, **2005**, 60, 1590
8. R.H. Callihan, R.B. Stallknecht, M. Dwelle, M. Blicharazyc, *Am. Potato J.*, **1976**, 53, 253
9. J.C. Pringle (Jr.), L.W.J. Anderson, R.W. Raines, *J. Agric. Food Chem.*, **1978**, 26, 1143
10. A.J. Gong, C.M. Ye, Z.F. Lei, L.A. Liu, *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, **1999**, 22, 2535
11. A. Bouaid, A. Martín-Esteban, P. Fernández, C. Cámara, *Fresenius' J. of Anal. Chem.*, **2000**, 367, 291
12. A. Cessna, D.L. Benoit, *Pest. Sci.*, **1992**, 35, 355
13. F. Chapuis, V. Pichon, F. Lanza, *J. Chromatogr. A*, **2003**, 999, 23
14. C. Stalikas, D. Knopp, R. Niessner, *Environ. Sci. & Technol.*, **2002**, 36, 3372
15. N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull, *Trends Anal. Chem.*, **2001**, 20, 477
16. Y. Picó, R. Rodríguez, J. Mañes, *Treds Anal. Chem.*, **2003**, 22, 133
17. F. Chapuis, V. Pichon, F. Lanza, B. Sellergren, M.C. Hennion, *J. Chromatogr. B*, **2004**, 804, 93
18. E. Turiel, A. Martín-Esteban, P. Fernández, C. Pérez-Conde, C. Cámara, *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 5133
19. A. Kotrikla, G. Gatidou, T.D. Lekkas, *J. Env. Sci. Health B*, **2006**, 41, 135
20. Q.X. Zhou, W.D. Wang, J.P. Xiao, J.H. Wang, G.G. Liu, Q.Z. Shi, G.L. Guo, *Microchim. Acta*, **2006**, 152, 215
21. W.T. Ma, G.B. Jiang, Z.W. Cai, *Int. J. Env. Anal. Chem.*, **2005**, 85, 1117



22. A.T.K. Tran, R.V. Hyne, P. Doble, *Chemosphere*, **2007**, 67, 944
23. R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, E. Herrero-Hernández, *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1085, 199
24. K. Stobb, H.P. Singer, C.W. Goetz, M. Ruff, S.R. Mueller, *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1097, 138
25. L. Zarpon, G. Abate, L.B.O. dos Santos, J.C. Masini, *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 579, 81
26. H. Katsumata, S. Kaneco, T. Suzuki, K. Ohta, *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 577, 214
27. V. Pichon, M.C. Hennion, *J. Chromatogr. A*, **1994**, 665, 269
28. H. Sabik, R. Jeannot, *J. Chromatogr. A*, **1998**, 818, 197
29. N. Masqué, M. Galia, R.M. Marcé, F. Borrull, *Analyst*, **1997**, 122, 425
30. R.C.J.A. Steen, A.C. Hogenboom, P.E.G. Leonards, R.A.L. Peerboom, W.P. Cofino, U.A.T. Brinkmann, *J. Chromatogr. A*, **1999**, 857, 157
31. D.A. Azevedo, S. Lacorte, P. Viana, D. Barceló, *Chromatographia*, **2001**, 53, 113
32. M.P. Tsyurupa, M.M. Ilyin, V.A. Andreeva, V.A. Davankov, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1995**, 352, 672
33. D. Puig, D. Barceló, *J. Chromatogr. A*, **1996**, 733, 371
34. E. Turiel, P. Fernández, C. Pérez-Conde, C. Cámara, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 872, 299
35. Y. Picó, M. Fernández, M.J. Ruiz, G. Font, *J. Biomed. Biophys. Methods*, **2007**, 70, 117
36. X.L. Zhang, D. Martens, P.M. Kramer, A.A. Kettrup, X.M. Liang, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1133, 112
37. K.A. Hassal, "The biochemistry and uses of pesticides", McMillan Press Ltd., 1990, Londres, cap. 1 y 2
38. M.G. Rubio, V.B. font, A.M. Díaz, M.J.A. Canada, *Anal. Letters*, **2006**, 39, 835
39. S. Navarro, J. Oliva, A. Barba, C. García, *J. AOAC Int.*, **2000**, 83, 1239
40. A. Hildebrandt, S. Lacorte, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2007**, 387, 1459



41. R.N. Lerch, Y.X. Li, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **2001**, 79, 167
42. J.C. Chuang, J.M. van Emon, R. Jones, J. Durnford, R.A. Lordo, *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 583, 32
43. U. Schobel, I. Coille, A. Brecht, M. Steinwand, G. Gauglitz, *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 5172
44. P. Onnerfjord, S. Eremin, J. Emneus, G. Marko-Varga, *J. Immunol. Methods*, **1998**, 213, 31
45. E.G. Matveeva, J.V. Samsonova, S.A. Eremin, *J. Fluorescence*, **1997**, 7, 211
46. U. Schobel, C. Barzel, G. Günter, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **2000**, 366, 646
47. B.M. Brena, L. Arellano, C. Rufo, M.S. Last, J. Montano, E.E. Cerni, G. Gonzalez-Sapientza, J.A. Last, *Env. Sci. Technol.*, **2005**, 39, 3896
48. U. Maqbool, Anwar-ul-Haq, M.J. Qureshi, M.Z. Iqbal, B. Hock, K. Kramer, *J. Env. Sci. Health B*, **2002**, 37, 307
49. S.M. Schraer, S.R. Shaw, M. Boyette, R.H. Coupe, E.M. Thurman, *J. Food Agric. Chem.*, **2000**, 48, 5881
50. R.G. Price, I. Baranowska, H.M.T. Griffith, R.A. Abuknesha, H. Barchanska, *Biomarkers*, **2006**, 11, 291
51. A.P. Deng, M. Franek, V. Kolar, *Food Agric. Immunol.*, **1999**, 11, 135
52. M. Franek, K. Hruska, *Vet. Med.*, **2005**, 50, 1
53. M.A. Bacigalupo, A. Ius, R. Longhi, G. Moroni, *Talanta*, **2003**, 61, 539
54. P. Onnerfjord, G. Marko-Varga, *Chromatographia*, **2000**, 51, 199
55. M.A. Nelson, A. Gates, M. Dodlinger, D.S. Hage, *Anal. Chem.*, **2004**, 76, 805
56. M. Franek, A.P. Deng, V. Kolar, *Anal. Chim. Acta*, **2000**, 412, 19
57. E. Turiel, P. Fernández, C. Pérez-Conde, A.M. Gutiérrez, C. Cámara, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1999**, 365, 658
58. C. Wittmann, R.D. Schmidt, *J. Agric. Food Chem.*, **1994**, 42, 1041
59. T.D. Bucheli, F.C. Gruebel, S.R. Muller, R.P. Schwarzenbach, *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 1569
60. F. Perreau, J. Einhorn, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2006**, 386, 1449



61. C. Basheer, S. Jegadesan, S. Valiyaveettil, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1087, 252
62. X.Z. Hu, J.X. Yu, Z.G. Yan, L.S. Ni, J.F. Lin, P. Wang, J. Li, X. Huang, X.G. Chu, Y.B. Zhang, *J. AOAC Int.*, **2004**, 87, 972
63. D.A. Lambropoulo, I.K. Konstantinou, T.A. Albanis, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **2000**, 78, 223
64. M. Forcada, J. Beltrán, F.J. López, F. Hernández, *Chromatographia*, **2000**, 51, 362
65. C. Aguilar, A. Peñalver, E. Pocurull, E. Ferre, F. Borrull, R.M. Marcè, *J. Chromatogr. A*, **1999**, 844, 425
66. J. Dallüge, T. Hankemir, R.J.J. Vreelus, U.A.Th. Brinkmann, *J. Chromatogr. A*, **1999**, 890, 377
67. C. Basheer, S. Jegadesan, S. Valiyaveettil, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1087, 252
68. R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, E. Miranda Cruz, J. Domínguez Alvarez, J. Hernández-Méndez, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1122, 194
69. M.H. El-Saeid, I. Kanu, R.C. Anyanwu, M.A. Saleh, *The Scientific World Journal*, **2005**, 5, 11
70. L.F.C. Melo, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim, *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1073, 75
71. S.H. Lee, S.K. Lee, Y.H. Park, H. Kim, D.W. Lee, *Bull. Kor. Chem. Soc.*, **1999**, 20, 1165
72. C. Aguilar, I. Ferrer, F. Borrull, R.M. Marcé, D. Barceló, *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 386, 237
73. F. Hernández, C. Hidalgo, J.V. Sancho, F.J. López, *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 3322
74. I. Ferrer, M.C. Hennion, D. Barceló, *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 4508
75. S. Dupas, P. Scribe, L.F. Dubernet, *J. Chromatogr. A*, **1996**, 737, 117
76. T. Visser, M.J. Vrendenbregt, G.J. tenHove, A.P.J.M. deJong, G.W. Somsen, *Anal. Chim. Acta*, **1997**, 342, 151
77. R.B. Geerdink, W.M.A. Niessner, U.A.T. Brinkmann, *J. Chromatogr. A*, **2001**, 910, 291
78. S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.*, **1984**, 56, 111





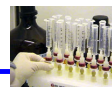
79. C. Desiderio, S. Fanali, *Electrophoresis*, **1992**, 13, 698
80. C.H. Chang, C.J. Chen, Y.C. Chuang, G.R. Her, *Electrophoresis*, **2006**, 27, 4303
81. A. de Rossi, M. Sinibaldi, A. Berti, C. Desiderio, *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.*, **2005**, 28, 537
82. F. Prieto, L.M. Lechuga, A. Calle, C. Domínguez, *Appl. Sci. Environ.*, **1998**, 263
83. J. Dostalek, J. Homola, *Sensors & Actuators B*, **2008**, 129, 303
84. A. Hipólito-Moreno, M.E. León-González, L.V. Pérez-Arribas, L.M. Polo-Díez, *Anal. Chim. Acta*, **1998**, 362, 187
85. A.J. Baeumner, R.D. Schmid, *Biosensors & Bioelectronics*, **1998**, 13, 519
86. C. Nakamura, M. Hasegawa, N. Nakamura, J. Miyake, *Biosensors & Bioelectronics*, **2003**, 18, 599
87. C.G. Siontorou, D.P. Nikolelis, U.J. Krull, K.L. Chiang, *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 3109
88. M. Oyama, T. Ikeda, T.K. Lim, K. Ikebukuro, Y. Masuda, I. Karube, *Biotechnol. Bioeng.*, **2001**, 71, 217
89. Codex Alimentarius
90. Directiva 2006/11/CE
91. M. Danaher, H. De Ruyck, S.R.H. Crooks, G. Dowling, M. O'Keeffe, *J. Chromatogr. B*, **2007**, 845, 1
92. R. Halko, C.P. Sanz, Z.S. Ferrera, J.J.S. Rodríguez, *J. AOAC Int.*, **2006**, 89, 1403
93. S.B. Singh, G.D. Foster, S.U. Khan, *J. Chromatogr. A.*, **2007**, 1148, 152
94. S.B. Singh, G.D. Foster, S.U. Khan, *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 105
95. W. Zhang, P. Tempest, Tetrahedron Letters, 2004, *Tetrahedron Letters*, **2004**, 45, 6757
96. E.A. Hogendoorn, K. Westhuis, E. Dijkman, E.A.G. Heusinkveld, P. Chamraskul, P. Biadul, R.A. Baumann, A.A. Cornelese, M.A. van der Linden, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **2000**, 78, 67
97. C. Blasco, G. Font, Y. Picó, *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1098, 37
98. T.M. Pawlowski, C.F. Poole, *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, 46, 3124



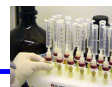
99. S.J. Lehotay, C.H. Lee, *J. Chromatogr. A*, **1997**, 785, 313
100. N. Nose, S. Kobayashi, A. Tanaka, A. Hirose, A. Watanabe, *J. Chromatogr.*, **1977**, 130, 410
101. R. Jeannot, H. Sabik, E. Sauvard, E. Gessin, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 379, 51
102. D.P. Zamora, J.L.M. Vidal, M.M. Galera, A.G. Frenich, J.L.L. González, M.R. Arahál, *Talanta*, **2003**, 60, 335
103. A.G. Frenich, D.P. Zamora, J.L.M. Vidal, M.M. Galera, *Anal. Chim. Acta*, **2003**, 477, 211
104. E.A. Hogendoorn, K. Westhuis, E. Dijkman, E.A.G. Eusinkweld, P. Chauvaskul, P. Biadul, R.A. Baumann, A.A. Cornelese, M.A. van der Linden, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **2000**, 78, 67
105. R. Halko, C.P. Sanz, Z.S. Ferrera, J.J.S. Rodríguez, *Chromatographia*, **2004**, 60, 151
106. A. Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 569, 132
107. H.L. Pease, J.A. Gardiner, *J. Agric. Food Chem.*, **1969**, 17, 267
108. H.L. Pease, R.F. Holt, *J. AOAC*, **1971**, 54, 1399
109. J.J. Kirkland, R.F. Holt, H.L. Pease, *J. Agric. Food Chem.*, **1973**, 21, 368
110. H. Pyysalo, *J. Agric. Food Chem.*, **1977**, 25, 995
111. G.H. Tjan, J.T.A. Jansen, *J. AOAC*, **1979**, 62, 769
112. P.J. Bushway, B.E.S. Young, L.R. Paradis, L.B. Perkins, *J. AOAC*, **1994**, 77, 1243
113. M.T. Lafuente, J.L. Tadeo, J.J. Tuset, *J. Chromatogr.Sci.*, **1987**, 25, 84
114. P. Corti, E. Dreassi, N. Politi, C. Aprea, *Food Addit. Contam.*, **1991**, 8, 607
115. J.E. Farrow, R.A. Hoodless, M. Sargent, J.A. Sidwell, *Analyst*, **1977**, 102, 752
116. D.M. Gilvydis, S.M. Walters, *J. AOAC*, **1990**, 73, 753
117. P. Corti, E. Dreassi, N. Politi, C. Aprea, *Food Addit. Contam.*, **1992**, 9, 243
118. N. Aharonson, A. Ben-Aziz, *J. AOAC*, **1973**, 56, 1330
119. M. Oishi, K. Onishi, I. Kano, H. Nakazawa, *J. AOAC*, **1994**, 77, 1293



120. R.V. Arenas, N.A. Johnson, *J. AOAC*, **1994**, 77, 710
121. R.V. Arenas, H. Rahman, N.A. Johnson, *J. AOAC*, **1996**, 79, 579
122. M.S. Young, D.J. Philips, P.C. Iraneta, J. Krol, *J. AOAC*, **2001**, 84, 556
123. M.S. Young, M.F. Early, C.R. Mallet, J. Krol, *J. AOAC*, **2001**, 84, 1608
124. W.J. Blanchflower, A. Cannavan, D.G. Kennedy, *Analyst*, **1994**, 119, 1325
125. D.J. Fletouris, N.A. Botsoglou, I.E. Psomas, A.I. Mantis, *Analyst*, **1994**, 119, 2801
126. D.J. Fletouris, N.A. Botsoglou, I.E. Psomas, A.I. Mantis, *J. AOAC*, **1996**, 79, 1281
127. H. De Ruyck, R. Van Renterghem, H. De Ridder, D. De Brabander, *Food Control*, **2000**, 11, 165
128. M. Danaher, M. O'Keeffe, J.D. Glennon, *Anal. Chim. Acta*, **2003**, 483, 313
129. L. Moreno, F. Imperiale, L. Mottier, L. Alvarez, C. Lanusse, *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 536, 91
130. A.G.V. de Prada, O.A. Loaiza, B. Serra, D. Morales, P. Martínez.Ruiz, A.J. Reviejo, J.M. Pingarron, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2007**, 388, 227
131. R.T. Wilson, J.S. Groneck, A.C. Henry, L.R. Rowe, *J. AOAC*, **1991**, 74, 56
132. B. Boudat, M. Garnier, in L.A. van Ginkel, A. Ruiters (eds.) *Proceedings of EuroResidue IV Conference on Residue of Veterinary Drugs in Food*, Veldhoven, The Netherlands, RIVM, 2000, p 361
133. G. Balizs, *J. Chromatogr. B*, **1999**, 727, 167
134. G. Dowling, H. Cantwell, M. O'Keeffe, M.R. Smyth, *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 529, 285
135. C. Nerenberg, R.A. Runkel, S.B. Matin, *J. Pharm. Sci.*, **1978**, 67, 1553
136. C. Nerenberg, I. Tsina, S. Matin, *J. AOAC*, **1982**, 65, 635
137. W.H. Newsome, J.B. Shields, *J. Agric. Food Chem.*, **1981**, 29, 220
138. W.H. Newsome, P.G. Collins, *J. AOAC*, **1987**, 70, 1025
139. L. Johnson, G.A. Baster, S.R.H. Crooks, D.L. Brandon, C.T. Elliot, *Food Agric. Immun.*, **2002**, 14, 209
140. D.L. Brandon, R.G. Binder, A.H. Bates, W.C. Montague Jr., *J. Agric. Food Chem.*, **1992**, 40, 1722



141. R.J. Bushway, D.L. Brandon, A.H. Bates, L. Li, K.A. Larkin, B.S. Young, *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, 43, 1407
142. D.L. Brandon, R.G. Binder, A.H. Bates, W.C. Monatague Jr., *J. Agric. Food Chem.*, **1994**, 42, 1588
143. D.L. Brandon, A.H. Bates, R.G. Binder, W.C. Monatague Jr., *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 5791
144. M. Anastassiades, W. Schwack, *J. Chromatogr. A*, **1998**, 825, 45
145. J. Markus, J. Sherma, *J. AOAC*, **1992**, 75, 1134
146. W.J.A. VandenHeuvel, D.E. Wolf, B.H. Arison, R.P. Buhs, J.R. Carlin, R.L. Ellsworth, T.A. Jacob, F.R. Kinszy, J.L. Smith, N.R. Trenner, R.W. Walker, F.J. Wolf, *J. Agric. Food Chem.*, **1978**, 26, 1357
147. T.A. Jacob, J.R. Carlin, R.W. Walker, F.J. Wolf, W.J.A. VandenHeuvel, *J. Agric. Food Chem.*, **1975**, 4, 704
148. W.J.A. VandenHeuvel, T.A. Jacob, J.L. Smith, N.R. Trenner, R.W. Walker, F.J. Wolf, *Anal. Chem.*, **1972**, 44, 14
149. A.M. Marti, A.E. Mooser, H. Koch, *J. Chromatogr.*, **1990**, 498, 14
150. S. Cline, A. Felsot, L. Wei, *J. Agric. Food Chem.*, **1981**, 29, 1087
151. P.C. Bardalaye, W.B. Wheeler, *J. AOAC*, **1986**, 69, 114
152. W.J.A. VandenHeuvel, J.R. Carlin, R.L. Ellsworth, F.J. Wolf, R.W. Walker, *Biomed. Mass Spectrom.*, **1974**, 1, 190
153. W.J. VandenHeuvel, J.S. Wood, M. DiGiovanni, R.W. Walker, *J. Agric. Food Chem.*, **1977**, 25, 386
154. A. Tanaka, Y. Fujimoto, *J. Chromatogr.*, **1976**, 117, 149
155. G. Balizs, G. Erbach in N. Haagsma, A. Ruiter (eds.) Proceedings of EuroResidue III Conference on Residue of Veterinary Drugs in Food, Veldhoven, The Netherlands, RIVM, 1996, p 223
156. B. Oosterhuis, J.C.F.M. Wetsteyn, C.J. van Boxtel, *Ther. Drug Monit.*, **1980**, 6, 215
157. L.H. Leenhers, R. Engel, W.E. Spruiet, W.J. Meuling, M.J. Jongen, *J. Chromatogr.*, **1993**, 613, 89
158. M.S. Bull, G.R.E. Shume, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1987**, 5, 501
159. A.R. Long, L.C. Hsieh, C.R. Short, S.A. Barrer, *J. Chromatogr.*, **1989**, 475, 404



160. J.A. Bogan, S. Marriner, *J. Pharm. Sci.*, **1980**, 69, 422
161. M.D. Rose, *Analyst*, **1999**, 134, 1023
162. A. Cannavan, S.A. Hagan, D.G. Kennedy, *J. Chromatogr. B*, **1998**, 718, 103
163. G.S. Stubbings, J. Tarbin, A. Cooper, M. Sharman, T. Bigwood, P. Robb, *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 547, 262
164. G. Karlaganis, G.J. Munst, J. Bircher, B. Burkhardt, J. Eckert, *Experientia*, **1979**, 35, 950
165. M. Alvinerie, P. Galtier, *J. Chromatogr.*, **1986**, 374, 409
166. R.V. Arenas, N.A. Johnson, *J. AOAC Int.*, **1995**, 78, 642
167. D.J. Fletouris, E.P. Papapanagiotou, D.S. Nakos, I.E. Psomas, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 893
168. N.A. Botsoglou, D.J. Fletouris, I.E. Psomas, V.N. Vassilopoulos, *J. Liq. Chromatogr.*, **1994**, 17, 4229
169. A. Negro, M.L. Alvarez-Bujidos, A.I. Ortiz, J.C. Cubria, R. Méndez, D. Ordóñez, *J. Chromatogr.*, **1992**, 576, 135
170. E. Turiel, J.L. Tadeo, P.A.G. Cormack, A. Martín-Esteban, *Analyst*, **2005**, 130, 1601

## *IV. PARTE EXPERIMENTAL*







# 1. EMPLEO DE POLÍMEROS IMPRESOS NO COVALENTES PARA LA DETERMINACIÓN DE TRIAZINAS EN VEGETALES







Se ha puesto a punto un método de extracción en fase sólida empleando un polímero impreso con propazina para la limpieza selectiva de muestras vegetales, de forma que pueda llevarse a cabo la cuantificación de las triazinas presentes en dichas muestras.

Una vez sintetizados los polímeros impreso (MIP) y no impreso (NIP) siguiendo un procedimiento de síntesis no covalente, se han optimizado los procesos de carga, lavado y elución, de forma que se obtuviera la máxima recuperación posible de las triazinas en el MIP y se minimizara dicha recuperación en el NIP. Con ello se han evaluado las interacciones tanto específicas como no específicas entre las triazinas y los polímeros, minimizando estas últimas.

En las condiciones óptimas de carga (*tolueno*), lavado (*5x1 mL de una disolución de acetonitrilo:tolueno 1:4*) y elución (*1 mL de acetonitrilo y 7x1 mL de metanol*), el MIP fue capaz de reconocer selectivamente, no sólo al analito plantilla (propazina), sino a otras triazinas con una estructura similar, tales como simazina, atrazina, desisopropilatrazina o desetilatrazina. En estas condiciones, la recuperación de las triazinas en el MIP es superior al 80% mientras que en el polímero no impreso es inferior a un 10% en todos los casos, lo que demuestra la ausencia de interacciones inespecíficas.

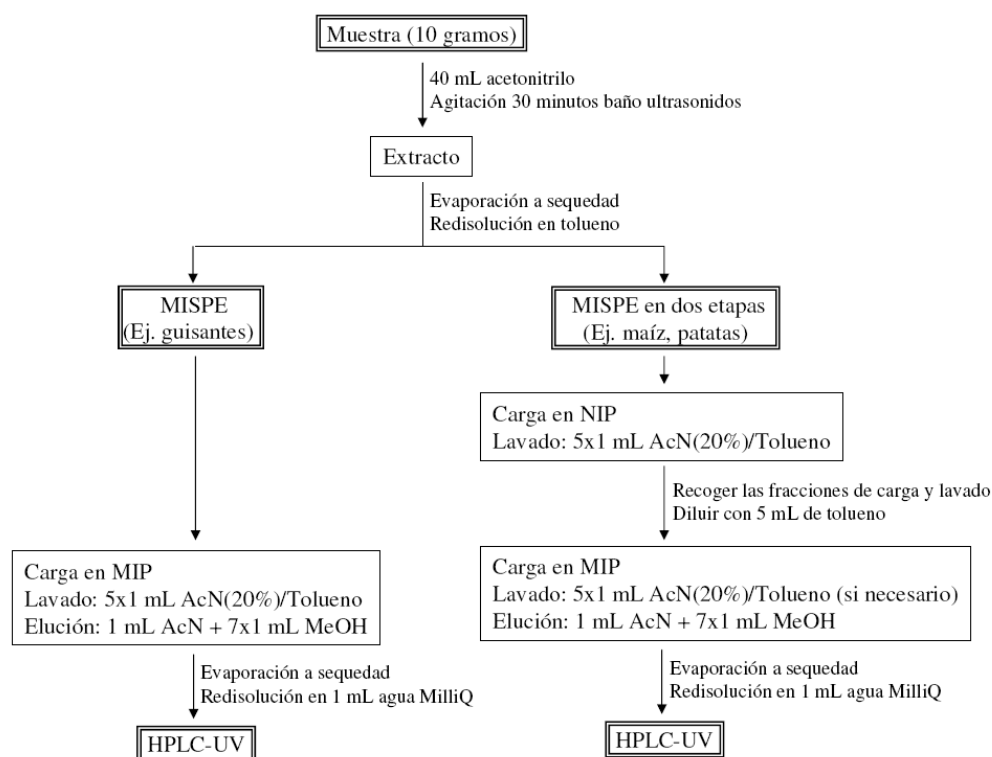
El método de extracción en fase sólida optimizado se ha aplicado con éxito a la limpieza de extractos de muestras de guisantes, permitiendo eliminar la mayor parte de los componentes de la matriz que interfieren en el análisis de las triazinas empleando una única etapa de limpieza. De esta forma, ha sido posible cuantificar las diferentes triazinas mediante HPLC-UV a niveles de concentración inferiores al límite máximo de residuos legislado (20-50 ng/g).

En el caso de las muestras de maíz y patatas, la limpieza mediante el proceso MISPE no condujo a resultados satisfactorios, pues aún persistían compuestos que interferían en la determinación de algunas de las triazinas. Así, por ejemplo, en la muestra de patatas se podían cuantificar todas las triazinas estudiadas excepto la



desisopropilareazina (DIA), mientras que en el caso de las muestras de maíz, tan sólo era posible determinar la simazina y la atrazina. En estos casos, en que la limpieza mediante el procedimiento MISPE descrito no era suficiente para eliminar todas las interferencias, el método se modificó ligeramente mediante la introducción de una etapa previa de limpieza de los extractos de la muestra en un polímero no impreso. Mediante este segundo procedimiento, ha sido posible cuantificar las triazinas en extractos de muestras vegetales más complejas, tales como maíz o patatas. El límite de detección obtenido era considerablemente inferior al límite máximo de residuos legislado para estos compuestos.

Los procedimientos aplicados para la determinación de las triazinas presentes en muestras enriquecidas se muestran esquematizados en la figura 19:



**FIGURA 19: Procedimiento experimental seguido para la limpieza de extractos de muestras vegetales mediante extracción en fase sólida utilizando un polímero impreso no covalente con propazina**



El empleo del polímero no impreso como adsorbente para una limpieza previa de los extractos ha permitido asimismo prolongar considerablemente la vida útil del polímero impreso. Este procedimiento puede adaptarse fácilmente a otros analitos y muestras, permitiendo mejorar los problemas que se pueden dar en procesos de la extracción en fase sólida mediante polímeros de impresión molecular aplicarlos a la limpieza de muestras extraordinariamente complejas.

Este trabajo se ha publicado en la revista *Analytical and Bioanalytical Chemistry* bajo el título ***“Clean-up of triazines in vegetable extracts by molecularly imprinted solid phase extraction using a propazine imprinted polymer”***. Asimismo, se ha presentado en los congresos:

- MIP2002: Second International Workshop on Molecularly Imprinted Polymers (La Grande Motte, Francia, 2002)
- XIII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica/VIII International Symposium of Analytical Methodology in the Environmental Field (La Coruña, 2003)

C. Cacho · E. Turiel · A. Martín-Esteban  
C. Pérez-Conde · C. Cámara

## Clean-up of triazines in vegetable extracts by molecularly-imprinted solid-phase extraction using a propazine-imprinted polymer

Received: 3 February 2003 / Accepted: 13 March 2003 / Published online: 9 May 2003  
© Springer-Verlag 2003

**Abstract** An analytical methodology based on a molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) procedure was developed for the determination of several triazines (atrazine, simazine, desethylatrazine (DEA), desisopropyl-atrazine (DIA), and propazine) in vegetable samples. A methacrylic acid-based imprinted polymer was prepared by precipitation polymerisation using propazine as template and toluene as porogen. After removal of the template by Soxhlet extraction, the optimum loading, washing, and elution conditions for MISPE of the selected triazines were established. The optimised MISPE procedure was applied to the extraction of the selected triazines in pea, potato, and corn sample extracts and a high degree of clean-up was obtained. However, some remaining interferences, non-specifically and strongly bound to the polymeric matrix, appeared in the chromatogram, preventing quantification of DIA in potatoes and DIA, DEA, and propazine in corn samples. Thus, a new clean-up protocol based on the use of a non-imprinted polymer for removal of these interferences prior to the MISPE step was devel-

oped. By following the new two-step MISPE procedure, the matrix compounds were almost completely removed, allowing the determination of all the triazines selected at concentration levels below the established maximum residue limits, making the developed procedure suitable for monitoring these analytes in vegetable samples.

**Keywords** Molecularly-imprinted solid-phase extraction · Vegetable samples · Triazines · Propazine-imprinted polymer

### Introduction

Triazine herbicides have been widely used in recent years for weed control in several crops. Due to their persistence, triazine residues may remain in these crops [1], which is of public concern due to the negative effects they might have on the environment as well as on human health. In fact, some European countries have included simazine and atrazine, the most widely used triazines, on the list of pesticide residues to be controlled and have established the corresponding maximum residue limits (MRLs) allowed in food [2, 3]. The MRLs for these triazines vary within the 0.02 to 0.1 mg kg<sup>-1</sup> range depending on the vegetable, and it is therefore necessary to use analytical methods capable of detecting the presence of these herbicides at this low concentration level.

Triazines in vegetable samples are mainly determined by chromatographic methods [4], although, due to the lack of selectivity of commonly used detectors, it is necessary to include previous clean-up steps in order to remove matrix compounds. Traditionally, these clean-up steps use large amounts of organic solvents (methanol, ethylene chloride, hexane, acetone, acetonitrile and isopropanol) in organic–aqueous partition or adsorption chromatographic processes which are usually tedious, time-consuming and not always satisfactory [5, 6]. Recently, antibodies immobilised on an appropriate solid support, namely immunosorbents, have been successfully employed for the clean-up of pesticides in plant sample extracts [7, 8, 9]. This methodol-

C. Cacho · E. Turiel (✉) · C. Pérez-Conde · C. Cámara  
Departamento de Química Analítica,  
Facultad de Ciencias Químicas,  
Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria s/n,  
28040 Madrid, Spain  
e-mail: esther.turiel@irmm.jrc.be

A. Martín-Esteban  
Departamento de Química, Universidad Europea-CEES,  
Villaviciosa de Odón, 28670 Madrid, Spain

#### Present address:

E. Turiel  
Analytical Chemistry Unit,  
Institute for Reference Materials and Measurements,  
Joint Research Centre–European Commission,  
2440 Geel, Belgium

#### Present address:

A. Martín-Esteban  
Analytical Chemistry Unit,  
Institute for Reference Materials and Measurements,  
Joint Research Centre–European Commission,  
2440 Geel, Belgium

C. Cacho · E. Turiel · A. Martín-Esteban  
C. Pérez-Conde · C. Cámara

## Clean-up of triazines in vegetable extracts by molecularly-imprinted solid-phase extraction using a propazine-imprinted polymer

Received: 3 February 2003 / Accepted: 13 March 2003 / Published online: 9 May 2003  
© Springer-Verlag 2003

**Abstract** An analytical methodology based on a molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) procedure was developed for the determination of several triazines (atrazine, simazine, desethylatrazine (DEA), desisopropyl-atrazine (DIA), and propazine) in vegetable samples. A methacrylic acid-based imprinted polymer was prepared by precipitation polymerisation using propazine as template and toluene as porogen. After removal of the template by Soxhlet extraction, the optimum loading, washing, and elution conditions for MISPE of the selected triazines were established. The optimised MISPE procedure was applied to the extraction of the selected triazines in pea, potato, and corn sample extracts and a high degree of clean-up was obtained. However, some remaining interferences, non-specifically and strongly bound to the polymeric matrix, appeared in the chromatogram, preventing quantification of DIA in potatoes and DIA, DEA, and propazine in corn samples. Thus, a new clean-up protocol based on the use of a non-imprinted polymer for removal of these interferences prior to the MISPE step was devel-

oped. By following the new two-step MISPE procedure, the matrix compounds were almost completely removed, allowing the determination of all the triazines selected at concentration levels below the established maximum residue limits, making the developed procedure suitable for monitoring these analytes in vegetable samples.

**Keywords** Molecularly-imprinted solid-phase extraction · Vegetable samples · Triazines · Propazine-imprinted polymer

### Introduction

Triazine herbicides have been widely used in recent years for weed control in several crops. Due to their persistence, triazine residues may remain in these crops [1], which is of public concern due to the negative effects they might have on the environment as well as on human health. In fact, some European countries have included simazine and atrazine, the most widely used triazines, on the list of pesticide residues to be controlled and have established the corresponding maximum residue limits (MRLs) allowed in food [2, 3]. The MRLs for these triazines vary within the 0.02 to 0.1 mg kg<sup>-1</sup> range depending on the vegetable, and it is therefore necessary to use analytical methods capable of detecting the presence of these herbicides at this low concentration level.

Triazines in vegetable samples are mainly determined by chromatographic methods [4], although, due to the lack of selectivity of commonly used detectors, it is necessary to include previous clean-up steps in order to remove matrix compounds. Traditionally, these clean-up steps use large amounts of organic solvents (methanol, ethylene chloride, hexane, acetone, acetonitrile and isopropanol) in organic–aqueous partition or adsorption chromatographic processes which are usually tedious, time-consuming and not always satisfactory [5, 6]. Recently, antibodies immobilised on an appropriate solid support, namely immunosorbents, have been successfully employed for the clean-up of pesticides in plant sample extracts [7, 8, 9]. This methodol-

C. Cacho · E. Turiel (✉) · C. Pérez-Conde · C. Cámara  
Departamento de Química Analítica,  
Facultad de Ciencias Químicas,  
Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria s/n,  
28040 Madrid, Spain  
e-mail: esther.turiel@irmm.jrc.be

A. Martín-Esteban  
Departamento de Química, Universidad Europea-CEES,  
Villaviciosa de Odón, 28670 Madrid, Spain

#### *Present address:*

E. Turiel  
Analytical Chemistry Unit,  
Institute for Reference Materials and Measurements,  
Joint Research Centre–European Commission,  
2440 Geel, Belgium

#### *Present address:*

A. Martín-Esteban  
Analytical Chemistry Unit,  
Institute for Reference Materials and Measurements,  
Joint Research Centre–European Commission,  
2440 Geel, Belgium

ogy produces very clean sample extracts, due to the inherent selectivity associated with antigen–antibody interactions, which allows detection limits considerably below the established MRLs to be reached. However, the main drawbacks of the use of immunosorbents are still related to the expensive and time-consuming procedure for the isolation of antibodies with the desired properties and the need to immobilise them adequately on a solid support.

More recently, the use of molecularly imprinted polymers (MIPs) in solid-phase extraction procedures has proved to be a valuable technique for the selective extraction of organic compounds [10, 11, 12]. MIPs are obtained by polymerisation of an appropriate monomer and cross-linker in the presence of the target analyte (the template molecule). After polymerisation, the template molecule is removed by washing the polymer obtained, leaving cavities complementary in size and shape to the analyte and thus, theoretically, enabling the polymer to selectively rebind this molecule. In general, MIPs have shown high affinities for the analyte molecule, making them comparable to polyclonal antibodies, with the advantage of their simple and easy preparation.

MIPs have been successfully used for the extraction of several analytes in liquid samples (i.e. waters, urine) but few attempts have been made in the clean-up of solid sample extracts [13, 14, 15] and, in fact, the results obtained have not been completely satisfactory in all cases. For instance, in previous work [15] carried out in our laboratory, an imprinted polymer using propazine as a template, prepared by conventional bulk polymerisation, was shown to be highly appropriate for the selective extraction of several triazines from drinking and surface water samples. However, the degree of clean-up obtained for vegetable samples was not satisfactory, as some matrix components were co-extracted with target analytes, preventing their final determination. Thus, the main aim of this work was to develop molecularly-imprinted solid-phase extraction (MISPE) procedures useful for the determination of triazines in several vegetable samples at concentration levels below the established MRLs.

## Experimental

### Reagents

Methacrylic acid (MMA), azobisisobutyronitrile (AIBN), and ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) were obtained from Sigma–Aldrich Química (Madrid, Spain). Atrazine, desethylatrazine, desisopropylatrazine, simazine, and propazine were purchased from Riedel–de-Häen (Seelze, Germany). Stock standard solutions ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) were prepared in acetonitrile and stored at  $-18^\circ\text{C}$ .

Purified water was obtained from a MilliQ water system purchased from Millipore Ibérica (Madrid, Spain) and HPLC grade solvents (acetonitrile, toluene, acetic acid, hexane, dichloromethane and methanol) were obtained from Scharlab (Barcelona, Spain).

### Apparatus

All measurements were performed with an HPLC system from Thermo Separation Products consisting of a ConstaMetric 4100 Series high pressure pump, a Spectro Monitor 5000 photo diode-

array detector and a Rheodyne 7725i injection valve equipped with a 100- $\mu\text{L}$  loop. The analytes were separated on a Hypersil ODS column ( $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm i.d.}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ) by gradient elution from 70% of water (A) and 30% of acetonitrile (B) to 30% A and 70% B in 25 min. Triazine herbicides were monitored at 220 nm and quantified by external calibration using peak-area measurements.

### Polymer preparation

Molecularly imprinted polymers were prepared by precipitation polymerisation as follows: 1 mmol of propazine, 4 mmol of MMA, and 12 mL of toluene were placed in a 25 mL glass tube. The mixture was left in contact for five minutes and then 20 mmol of EDMA and 2 mmol of AIBN were added. The tube was sealed in a nitrogen atmosphere and placed in a water bath at  $60^\circ\text{C}$  to start the polymerisation process. After 24 h the polymer particles obtained were air dried and the template was removed by Soxhlet extraction with a methanol:acetic acid mixture (1:1) for 18 h. Non-imprinted polymers were prepared following the same procedure but without the addition of the template molecule.

### Sample preparation

Acetonitrile (40 mL) was added to 10 g of sample and the mixture was sonicated for 30 min. The supernatant was filtered through a  $0.45\text{-}\mu\text{m}$  filter, and the extracts were evaporated to dryness in a Univapo Concentrator system from Biogen Científica (Madrid, Spain) and redissolved in 1 mL of toluene containing  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  of each triazine for MISPE.

### Direct MISPE of sample extracts

The molecularly imprinted polymer (200 mg) was placed in an empty solid-phase extraction cartridge from J.T. Baker (Deventer, Holland) and conditioned with 50 mL of methanol, 50 mL of acetonitrile and 25 mL of toluene. The conditioning step used between samples consisted of  $2 \times 6 \text{ mL}$  of acetonitrile and  $2 \times 6 \text{ mL}$  of toluene. Next, the sample extracts were loaded onto the polymer and washed with  $5 \times 1 \text{ mL}$  of a toluene solution containing 20% of acetonitrile. Subsequently, the analytes were eluted with 1 mL of acetonitrile and  $7 \times 1 \text{ mL}$  of methanol. The extracts obtained were evaporated to dryness and redissolved in 1 mL of purified water for HPLC analysis.

### Two-step MISPE of sample extracts

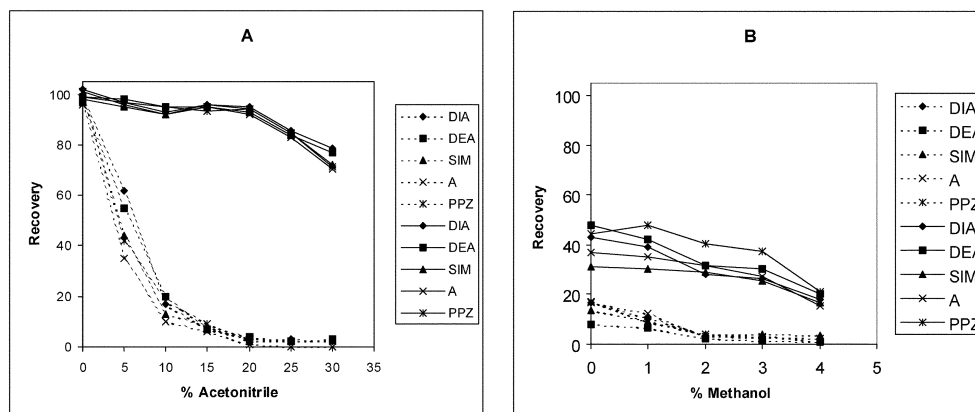
Non-imprinted polymer (200 mg) was placed in an empty solid-phase extraction cartridge and conditioned as described above for the imprinted polymer. Sample extracts were loaded onto the blank cartridge and washed with  $5 \times 1 \text{ mL}$  of a toluene solution containing 20% of acetonitrile. All fractions (breakthrough volume and washing solution) were collected in the same vial and diluted with 5 mL of toluene. The final solution obtained was loaded onto the MIP cartridge, and the MISPE procedure was performed as described above.

## Results and discussion

### Optimisation of the MISPE procedure

According to previous results obtained in our laboratory [15], propazine and toluene were selected as template and porogen respectively, for the preparation of an MAA-based imprinted polymer. In this case, the precipitation polymerisation technique was used, as this procedure al-

**Fig. 1** Variation of the recoveries obtained for triazines (500 ng mL<sup>-1</sup>) loaded in toluene (A) or in acetonitrile (B) on imprinted (solid lines) and non-imprinted (dashed lines) polymers as a function of the percentage of acetonitrile or methanol present in the washing solution



lowers the preparation of spherical polymer particles directly, avoiding the crushing and sieving steps. Moreover, this technique leads to a more homogeneous binding site distribution in comparison to that present in polymers obtained by bulk polymerisation [16].

The complexity of vegetable extracts requires optimisation of the whole MISPE procedure (loading, washing and elution steps) in order to obtain quantitative recoveries of the analytes with a high degree of selectivity. Concerning the loading solution, first experiments were made using toluene, as it has already been reported that most times recoveries are higher whenever the sample is loaded in the same solvent used as a porogen. However, acetonitrile was also evaluated for sample loading, as it is the solvent most commonly used in the extraction of triazines from vegetable samples. Since both the specific and non-specific interactions between the analytes and the polymer are based on hydrogen binding, the washing step was optimised in both cases by slightly increasing the polarity of the washing solution. Different toluene:acetonitrile and acetonitrile:methanol mixtures, respectively, were selected for this purpose. The experiments were carried out by loading solutions containing 500 ng mL<sup>-1</sup> (prepared in toluene or acetonitrile) onto the imprinted and non-imprinted polymers and the cartridges were washed with 5×1 mL of different washing solutions. Finally, the cartridges were dried and quantitative elution was easily accomplished using 7×1 mL of methanol in both cases. However, when the sample was loaded in toluene, a fraction of 1 mL of acetonitrile was first included in the elution step in order to prevent the formation of emulsions with methanol and remaining traces of toluene.

Figure 1 shows the variation of the recoveries obtained in both cases on the imprinted and non-imprinted poly-

mers, as a function of the percentage of acetonitrile or methanol present in the washing solution. As can be observed, non-specific interactions diminish in both cases as the polarity of the washing solution is increased, and the analytes can be completely removed from non-imprinted polymer when 20% of acetonitrile or 2% of methanol are present in the toluene or acetonitrile washing solution, respectively. On the other hand, it is clear that selective recognition of the triazines selected can take place in acetonitrile or in toluene, although the best recoveries for all analytes (from 92% to 98%) were obtained when the sample was loaded in toluene. Thus, loading of the sample in toluene and washing with a toluene solution containing 20% of acetonitrile were selected as optimum conditions for the MISPE procedure.

#### MISPE of sample extracts

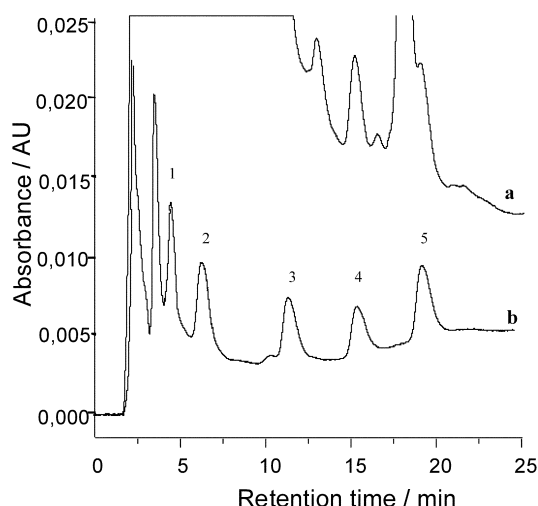
The developed procedure was applied to the trace enrichment and clean-up of triazines in pea sample extracts, since triazines are widely used for the protection of this crop. Pea extracts were prepared as described in the experimental section and spiked at the 20 ng g<sup>-1</sup> concentration level. After MISPE, the sample extracts were analysed and the recoveries obtained are shown in Table 1. Figure 2 shows the chromatograms obtained in the analysis of the spiked pea extracts with and without performance of the clean-up step using the imprinted polymer. As can be observed, the quantification of triazines without clean-up is not possible due to the high amount of interferent compounds appearing in the chromatograms (Fig. 2a). However, it can be seen that the imprinted polymer is able to discriminate between the large amount of compounds pre-

**Table 1** Average recoveries (%R) and RSDs (n=3) of triazines (20 ng g<sup>-1</sup>) after direct MISPE of plant sample extracts on propazine-imprinted polymer

	DIA		DEA		Simazine		Atrazine		Propazine	
	%R	RSD	%R	RSD	%R	RSD	%R	RSD	%R	RSD
Peas	70	8	75	6	87	7	76	6	78	5
Potatoes	n.d. <sup>a</sup>	—	88	5	91	5	93	4	116	5
Corn	n.d. <sup>a</sup>	—	n.d. <sup>a</sup>	—	72	8	93	7	180	10

<sup>a</sup>Not detected



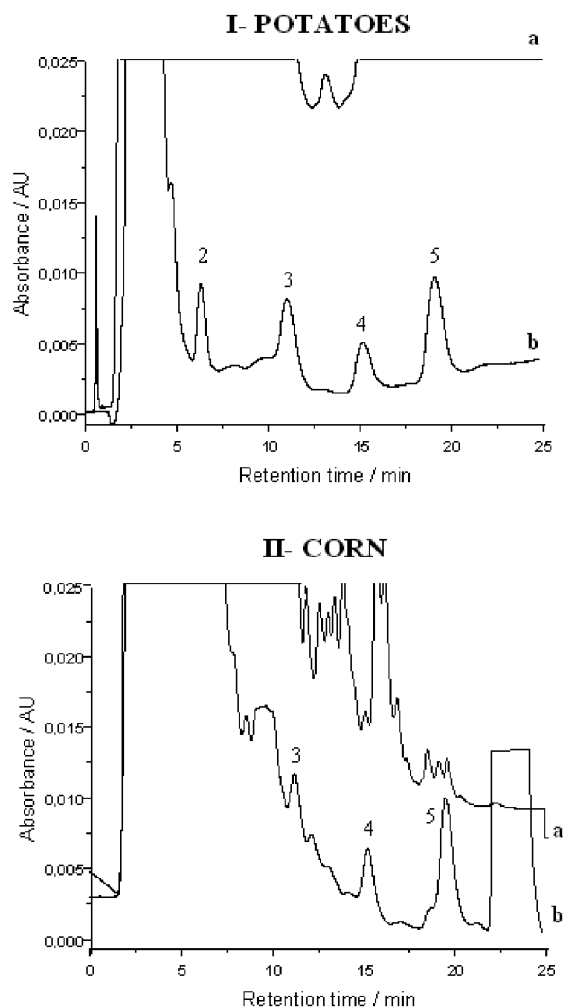


**Fig. 2** Chromatograms obtained at 220 nm, without (a) and with (b) MISPE, of pea sample extracts spiked with triazines ( $20 \text{ ng g}^{-1}$ ). Chromatographic conditions: See Experimental. Peak numbers: (1) DIA; (2) DEA; (3) Simazine; (4) Atrazine; (5) Propazine

sent in these samples, and all the selected triazines can be easily determined after the proposed MISPE procedure with quantitative recoveries in all cases (Fig. 2b).

The proposed MISPE procedure was further evaluated for the determination of selected triazines in more complex samples such as potatoes and corn. Figure 3I shows the chromatogram obtained with and without MISPE of a spiked ( $20 \text{ ng g}^{-1}$  concentration level) potato sample extract and Table 1 shows the recoveries obtained. As can be observed, a high degree of clean-up was obtained in this sample using the proposed MIPE procedure, and the amount of matrix compounds present in the final extract was considerably reduced. This fact is remarkable, since it is known that the analysis of potato extracts usually requires several clean-up steps in order to remove the starch present in these matrices, which normally interferes in the determination of the target analytes [17]. Using the proposed procedure, all the triazines could be determined in this sample with quantitative recoveries, with the exception of DIA, for which interference still remained.

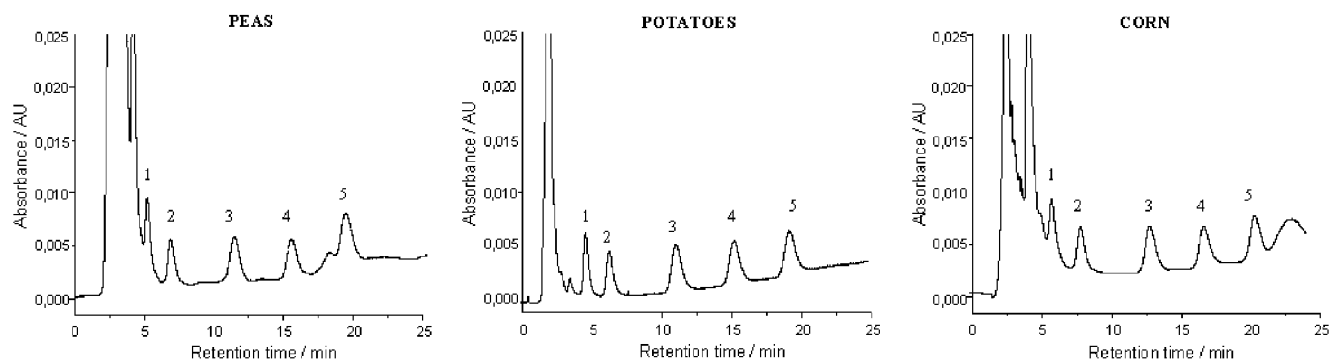
In the case of corn samples, the results obtained were not so satisfactory. Although a significant degree of clean-up was obtained (Fig. 3II), only simazine and atrazine could be determined with quantitative recoveries (Table 1). These results suggest that the optimised washing step used ( $5 \times 1 \text{ mL}$  of a solution of 20% of acetonitrile in toluene) was too weak to remove matrix compounds that interact strongly with the polymeric matrix. Accordingly, the use of an additional washing step with  $5 \times 1 \text{ mL}$  fractions of other organic solvents (i.e. hexane, dichloromethane) was tested. The results were not satisfactory, as the chromatograms obtained (not shown) were not better in terms of degree of clean-up and, in some cases (dichloromethane), the use of the additional washing step produced a loss in the recoveries of triazines. Moreover, after a few runs loading corn-sample extracts, a decrease in the recogni-



**Fig. 3** Chromatograms obtained at 220 nm, without (a) and with (b) MISPE, of potato (I) and corn (II) sample extracts spiked with triazines ( $20 \text{ ng g}^{-1}$ ). Chromatographic conditions: See Experimental. Peak numbers as in Fig. 2

tion capabilities of the imprinted-polymer, and thus a drop in the recoveries obtained, was observed, making it necessary to include a strong washing step consisting of  $50 \text{ mL}$  of a methanol:acetic acid (80:20) mixture, for complete polymer regeneration.

In order to overcome the drawbacks mentioned, and taking into account that matrix compounds were non-specifically retained by the polymeric matrix, a two-step MISPE procedure consisting of a combination of two polymeric cartridges (one non-imprinted and one imprinted) was carried out. In this way, theoretically, the non-imprinted polymer would retain the analytes and matrix compounds, but the analytes (and a low amount of matrix compounds) would easily be eluted by the washing solution, achieving a first clean-up of the sample extracts. Subsequently, clean sample extracts free of co-extractives would be obtained by using the direct MISPE procedure proposed previously. Keeping these comments in mind, a corn sample extract was prepared as described above and was loaded into the cartridge containing the non-im-



**Fig. 4** Chromatograms obtained at 220 nm, after two-step MISPE procedure, of pea, potato, and corn sample extracts spiked with triazines ( $20 \text{ ng g}^{-1}$ ). Chromatographic conditions: See Experimental. Peak numbers as in Fig. 2

**Table 2** Average recoveries (%R) and RSDs ( $n=3$ ) of triazines ( $20 \text{ ng g}^{-1}$ ) after two-step MISPE procedure of plant sample extracts on propazine-imprinted polymer

	DIA		DEA		Simazine		Atrazine		Propazine	
	%R	RSD	%R	RSD	%R	RSD	%R	RSD	%R	RSD
Peas	81	3	87	3	86	4	88	3	88	3
Potatoes	94	3	97	6	94	5	98	6	96	7
Corn	78	4	95	5	96	5	94	7	97	5

**Table 3** Detection limits<sup>a</sup> ( $\text{ng g}^{-1}$ ) of triazines in vegetable samples obtained using the proposed MISPE procedures

	Peas		Potatoes		Corn	
	Direct	Two-step	Direct	Two-step	Direct	Two-step
DIA	0.6	0.7	nd	0.9	nd	0.7
DEA	0.5	0.3	1.7	0.8	nd	0.9
Simazine	0.5	0.5	1.4	0.6	1.6	0.8
Atrazine	0.6	0.4	1.6	0.7	2.1	0.7
Propazine	0.5	0.3	1.6	0.7	nd	0.7

<sup>a</sup>Calculated as three times the signal-to-noise ratio

printed polymer. Loading and washing fractions were collected in the same vial (6 mL) and subsequently loaded into the MIP cartridge for direct MISPE. The degree of clean-up obtained was very satisfactory and all the selected triazines could be easily detected free of interferences in the chromatogram, but very low recoveries (around 35% in all cases) were obtained. This fact was attributed to the presence of acetonitrile (about 20%) in the solution collected from the non-imprinted cartridge and subsequently added to the MIP. However, it has to be noticed that the same percentage of acetonitrile was used before for the washing step without affecting the recoveries obtained (see Fig. 1A). Thus, it seems that the influence of the polarity of the solvent in the specific interactions is more critical during the binding step than when such interactions have already taken place. In order to minimise this negative effect, it was decided to dilute the solution collected from the non-imprinted cartridge with toluene before the loading step into the imprinted cartridge. Several recovery studies were then carried out with different dilutions of the solution collected, and it was found that the addition of 5 mL of toluene was enough to obtain quantitative recoveries for all the analytes tested.

The proposed two-step MISPE procedure was applied to the determination of triazines in pea, potato and corn

sample extracts. Figure 4 shows the chromatograms obtained after applying the two-step MISPE procedure to spiked ( $20 \text{ ng g}^{-1}$  concentration level) vegetable sample extracts. As can be observed, the chromatograms obtained are almost completely free of co-extractives, allowing the identification and quantification of all the triazines studied. The recoveries obtained (shown in Table 2) were quantitative in all cases, with relative standard deviations lower than 7%, demonstrating the suitability of the proposed two-step MISPE procedure for the determination of triazines in vegetable samples at a very low concentration levels.

The limits of detection, calculated as three times the signal-to-noise ratio, for the analysis of the selected triazines in the vegetable samples using both MISPE procedures (direct and two-step) are shown in Table 3. It is clear from the data obtained that triazines may be determined precisely and accurately by the proposed methods, at concentration levels well below the MRLs currently established.

## Conclusions

In this work the potential of MIPs for the clean-up of triazines in vegetable sample extracts has been clearly

demonstrated. In a first approach, the proposed MISPE procedure allows the determination of several triazines in the samples tested although some were not quantified in potato and corn samples due to the presence of matrix compounds which were co-eluted with the analytes. In these cases, quantitative recoveries for all the analytes in the vegetable samples tested were easily achieved by including a simple previous clean-up step using the non-imprinted polymer.

The proposed two-step MISPE procedure may be easily adapted to other analytes in different kinds of sample and may overcome the difficulties encountered until now in the application of MISPE to complex samples. It is important to stress that, from our point of view, the inclusion of a previous clean-up step does not reduce the potential of MIPs as selective recognition materials for certain applications, but it offers new alternatives for their use in the field of analytical chemistry.

**Acknowledgements** The authors wish to thank DGICYT (PB98-0768) and Programa Nacional de Alimentación del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2000-2003 (CAL01-006) for financial support, and Max Gorman for revising the manuscript.

## References

1. Primo Yúfera E, Carrasco Dorrien JM (1996) *Química Agrícola II: Plaguicidas y Fitorreguladores*. Editorial Alhambra, Madrid
2. <http://www.mcx.es/plaguicidas/plagas.htm>
3. European Community (1993) Council directive 93/58/EEC, OJ L211, p 6
4. Tadeo JL, Sánchez-Brunete C (1996) *Quim Anal* 15:53
5. Luchtfield RG (1985) *J Chromatogr Sci* 23:516
6. Luchtfield RG (1987) *J Assoc Off Anal Chem* 70:750
7. Lawrence JF, Menard C, Hennion M-C, Pichon V, Le Goffic F, Durand N (1996) *J Chromatogr A* 752:147
8. Martín-Esteban A, Fernández P, Cámara C (1997) *Fresenius J Anal Chem* 357:927
9. Herrera S, Martín-Esteban A, Fernández P, Stevenson D, Cámara C (1998) *Fresenius J Anal Chem* 362:547
10. Martín-Esteban A (2001) *Fresenius J Anal Chem* 370:795
11. Masque N, Marce RM, Borrull F (2001) *Trends Anal Chem* 20:477
12. Lanza F, Sellergren B (2001) *Chromatographia* 53:599
13. Muldoom MT, Stanker LH (1997) *Anal Chem* 69:803
14. Martín-Esteban A, Turiel E, Stevenson D (2001) *Chromatographia* 53:S434
15. Turiel E, Martín-Esteban A, Fernández P, Pérez-Conde C, Cámara C (2001) *Anal Chem* 73:5133
16. Tamayo FG, Casillas JL, Martín-Esteban A (2003) *Anal Chim Acta* 482:165-173
17. Pulido P, Barrero-Moreno JM, Perez-Conde MC (2000) *Anal Chim Acta* 417:85



# MIP2002: Second International Workshop on Molecularly Imprinted Polymers

## La Grande Motte, Francia, 2002



### DEVELOPMENT OF A MOLECULARLY IMPRINTED SOLID-PHASE EXTRACTION PROCESS FOR THE EXTRACTION AND CLEAN-UP OF TRIAZINES IN CORN SAMPLES

C. Cacho, E. Turiel, A. Martín-Esteban\*, C. Pérez-Conde and C. Cámara  
Dep. of Analytical Chemistry, Chemistry Faculty, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain  
\*Dep. of Environmental Chemistry, INIA, 28040, Madrid, Spain

#### INTRODUCTION

Triazinic herbicides (Fig. 1) have been widely used in the past century for weed control in several crops such as corn, peas, coffee or tea. Due their mobility and persistence, triazines accumulation in water, soil and vegetables have occurred, making these herbicides to be considered as important contaminants of our environment.

The analysis of these compounds in vegetable samples is not an easy task due to the complexity of the matrix and to the lack of selectivity of the common detectors employed. In the present work a MISPE procedure for the selective extraction and clean-up of several triazines in corn samples has been developed allowing the determination of the selected analytes at trace concentration level.

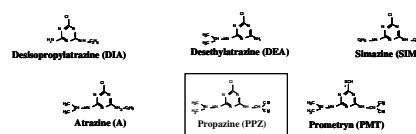


Fig. 1.- Structures of the triazines studied

#### POLYMERIZATION CONDITIONS AND MISPE OPTIMIZATION

	Name	μmol	Molar ratio
Template	Propazine	4.4	1
Monomer	Methacrylic acid	17.6	4
Cross-linker	Ethylene glycol dimethacrylate	88	20
Initiator	Azobisisobutyronitrile	2	---
Porogen volume	Toluene	25 ml	

Thermopolymerization at 70°C for 18 hours

Soxhlet extraction: HAC: MeOH (1:1) for 10 hours

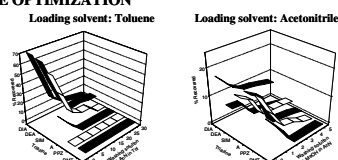


Fig.2.- Non-selective recovery of triazines on the Blank polymer using different washing conditions.

Selective recoveries of triazines on the MIP in the optimum washing conditions in each case.

Solvent	DIA	DEA	SIM	A	PPZ	PMT
Toluene	84	80	88	89	91	37
Acetonitrile	28	32	29	32	40	22

Optimum MISPE conditions: Loading the sample in 1 ml toluene, washing with 5x1 ml of a solution containing 15% acetonitrile in toluene, elution with 1 ml of Acetonitrile and 7 x 1 ml of Methanol

#### MISPE OF TRIAZINES FROM CORN SAMPLE EXTRACTS

**Preparation of the corn extract:** 20 ml of acetonitrile were added to 5 g of corn, the mixture was shaken for 30 min, and the supernatant was filtered through a 0.45 μm filter. Sample extracts were evaporated to dryness and redissolved in 1 ml of toluene, containing 200 μg l<sup>-1</sup> (equivalent to 40 ng/g) of each triazine (Solution A).

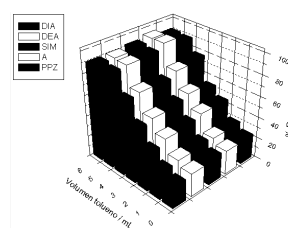
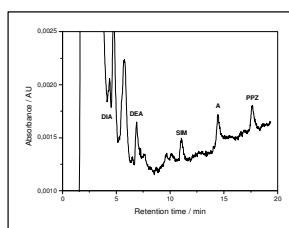
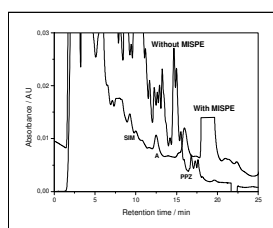
##### Procedure 2

Solution A was loaded into a cartridge containing the blank polymer, and the analytes were eluted using 5 ml of the washing solution (15% acetonitrile in toluene). All fractions (BTW and elution) were collected in the same vial (Solution B). MISPE of Solution B.

Increase of the recoveries obtained using procedure 2 by the addition of toluene to Solution B. Optimization of procedure 3.

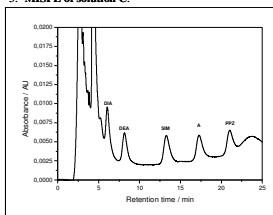
##### Procedure 1

Direct MISPE of Solution A



##### Procedure 3

- 1.- Procedure 2 for the obtaining of solution B.
- 2.- Addition of 5 ml of toluene to solution B (solution C)
- 3.- MISPE of solution C.



Obtained recoveries of triazines in corn sample extracts following the different MISPE procedures.

Procedure	DIA	DEA	SIM	A	PPZ
1	nd	nd	62	93	177
2	13	25	23	26	24
3	78	95	96	94	97

#### FURTHER EXPERIMENTS

At the present, further use of polymeric matrix before MISPE is under investigation in our laboratory as a general powerful tool for removing interfering compounds present in complex samples.

#### CONCLUSIONS

- A trace-enrichment and clean-up process for the determination of triazines in corn samples has been developed based on molecular imprinting technology.
- The proposed MISPE procedure allows the quantitative recovery of the s-chlorotriazines studied (DIA, DEA, SIM, A and PPZ).
- The PPZ-imprinted polymer shows a high degree of selectivity for triazinic herbicides.
- A considerable improvement in selectivity was achieved by using a Blank polymer to further remove matrix interfering compounds before MISPE allowing triazines determination according to nowadays regulations.



XIII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica/VIII International  
Symposium of Analytical Methodology in the Environmental Field  
La Coruña, 2003



USE OF MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS (MIPs) FOR  
TRIAZINE DETERMINATION IN VEGETABLE SAMPLES

C. Cacho, E. Turiel,<sup>1</sup> A. Martín-Esteban,<sup>1</sup> C. Pérez-Conde and C. Cámara.

Dep. of Analytical Chemistry, Chemistry Faculty, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>1</sup>Analytical Chemistry Unit, Institute for Reference Materials and Measurements, JRC-European Commission, 2440 Geel, Belgium.

INTRODUCTION

Triazine herbicides (Fig. 1) have been widely used in the past century for weed control in several crops such as corn, peas, potatoes or tea. Due their mobility and persistence, triazines accumulation in water, soil and vegetables have occurred, making these herbicides to be considered as important contaminants of our environment.

The analysis of these compounds in vegetable samples is not an easy task due to the complexity of the matrix and to the lack of selectivity of the common detectors employed. In the present work a MISPE procedure for the selective extraction and clean-up of several triazines in vegetable samples has been developed allowing the determination of the selected analytes at trace concentration level.

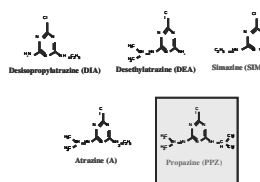


Fig. 1.- Structures of the triazines studied

POLYMERIZATION CONDITIONS

	Name	$\mu\text{mol}$	Molar ratio
Template	Propazine	4.4	1
Monomer	Methacrylic acid	17.6	4
Cross-linker	Ethylene glycol dimethacrylate	88	20
Initiator	Azobisisobutyronitrile	2	---
Porogen	Toluene	25 ml	---

Thermopolymerization at 70°C for 18 hours  
Soxhlet extraction: HAc : MeOH (1:1) for 10 hours

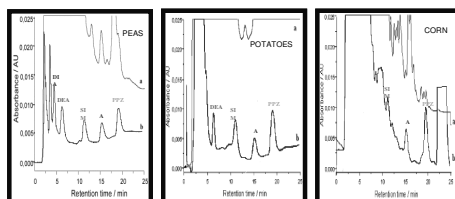
MISPE OF TRIAZINES FROM VEGETABLE SAMPLE EXTRACTS

Preparation of the vegetable extracts: 40 ml of acetonitrile were added to 10 g of sample, the mixture was sonicated for 30 min, and the supernatant was filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  filter. Sample extracts were evaporated to dryness and redissolved in 1 ml of toluene, containing 200  $\mu\text{g l}^{-1}$  (equivalent to 20 ng/g) of each triazine



DIRECT MISPE

The molecularly imprinted polymer (200 mg) was placed in an empty solid-phase extraction cartridge and conditioned with 50 ml of methanol, 50 ml of acetonitrile and 25 ml of toluene. The conditioning step between samples consisted in 2x6 ml of acetonitrile and 2x6 ml of toluene. Next, the sample extracts were loaded onto the polymer and washed with 5x1 ml of a toluene solution containing 20% of acetonitrile. Subsequently, the analytes were eluted with 1 ml of acetonitrile and 7x1 ml of methanol. The extracts obtained were evaporated to dryness and redissolved in 1 ml of pure water for HPLC analysis.



Chromatograms obtained at 220 nm

a: Without MISPE, b: Direct MISPE

	DIA		DEA		Simazine		Atrazine		Propazine	
	%R	RSD	%R	RSD	%R	RSD	%R	RSD	%R	RSD
Peas	70	8	75	6	87	7	76	6	78	5
Potatoes	n.d.	—	88	5	91	5	93	4	116	5
Corn	n.d.	—	n.d.	—	72	8	93	7	180	10

Average recoveries (%R) and RSD (n=3) for triazines  
(20 ng.g<sup>-1</sup>) in vegetable sample extracts after Direct  
MISPE clean-up

CONCLUSIONS

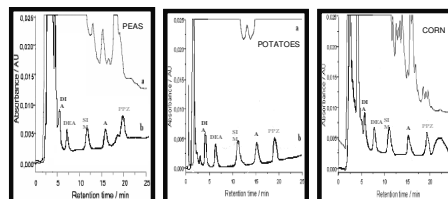
♦ The potential of MIPs for the clean-up of triazines in vegetable sample extracts has been clearly demonstrated.

♦ The proposed Direct MISPE procedure allows the quantification of several triazines in some of the samples evaluated. However, this clean-up procedure cannot be used for the quantification of all the triazines tested in more complex samples.

♦ Co-elution of matrix compounds in the Direct MISPE procedure which interfere in the determination of some triazines in complex matrices such as corn or potatoes may easily be avoided by the inclusion of a simple clean-up step in the non-imprinted polymer in the Two-step MISPE procedure.

TWO-STEP MISPE

Non-imprinted polymer (200 mg) was placed in an empty solid-phase extraction cartridge and conditioned as described above for the imprinted polymer. Sample extracts were loaded onto the blank cartridge and washed with 5x1 ml of a toluene solution containing 20% of acetonitrile. All fractions (breakthrough and washing solution) were collected in the same vial and diluted with 5 ml of toluene. The final solution was loaded onto the MIP cartridge, and the MISPE procedure was performed as described above.



Chromatograms obtained at 220 nm

a: Without MISPE, b: Two-step MISPE

	DIA		DEA		Simazine		Atrazine		Propazine	
	%R	RSD	%R	RSD	%R	RSD	%R	RSD	%R	RSD
Peas	81	3	87	3	86	4	88	3	88	3
Potatoes	94	3	97	6	94	5	98	6	96	7
Corn	78	4	95	5	96	5	94	7	97	5

Average recoveries (%R) and RSD (n=3) for triazines  
(20 ng.g<sup>-1</sup>) in vegetable sample extracts after Two-step  
MISPE clean-up

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank DGCYT (BQU2002-01348), Programa Nacional de Alimentación del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2000-2003 (CAL01-006) and Universidad Complutense de Madrid for financial support.





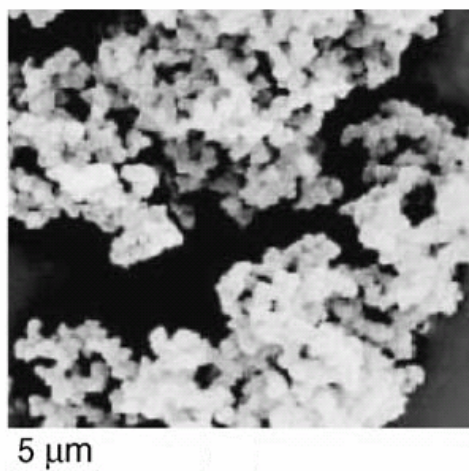
## *2. CARACTERIZACIÓN FÍSICO- QUÍMICA DE POLÍMEROS IMPRESOS MEDIANTE LA ISOTERMA DE LANGMUIR- FREUNDLICH*







El presente trabajo describe la caracterización morfológica y físico-química de un polímero impreso no covalente sintetizado empleando propazina como analito plantilla mediante un procedimiento de polimerización por precipitación. El análisis de la morfología del polímero se ha llevado a cabo mediante microscopía electrónica de barrido. El polímero impreso obtenido presenta aglomeraciones de partículas esféricas como se aprecia en la figura 20.



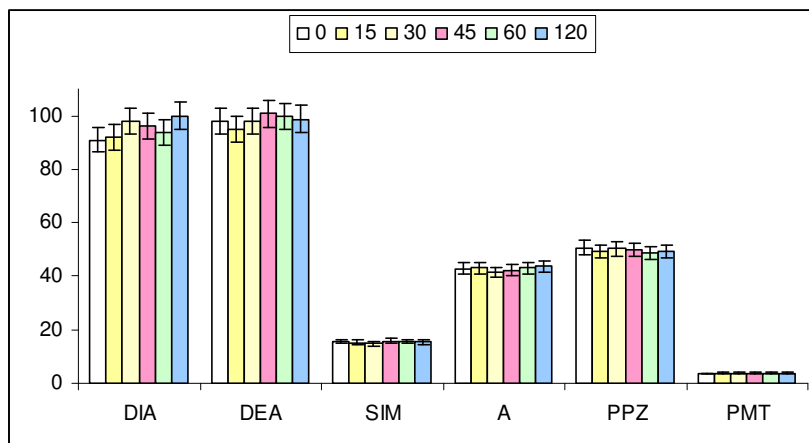
***FIGURA 20: Imagen del polímero impreso obtenida mediante microscopía electrónica de barrido***

La caracterización físico-química del polímero impreso se ha llevado a cabo mediante el estudio de las isotermas de adsorción de diferentes triazinas. El primer paso para la realización de los estudios de adsorción es garantizar que el sistema se encuentra en equilibrio termodinámico, por lo que se ha evaluado el tiempo mínimo necesario para obtener una recuperación estable de las diferentes triazinas. Las condiciones de trabajo han sido las optimizadas en el proceso MISPE descrito en el capítulo anterior: carga (1 mL de tolueno), lavado (5x1 mL de una disolución de acetonitrilo:tolueno 1:4) y elución (1 mL de acetonitrilo y 7x1 mL de metanol).

En la figura 21 se muestran las recuperaciones obtenidas para una disolución de 10 mg/L de cada una de las triazinas cuando el tiempo de contacto con el polímero varía desde 0 hasta 120 minutos. Como se puede apreciar, la recuperación es independiente



del tiempo de contacto en el intervalo estudiado, por lo que el equilibrio se alcanza instantáneamente.



**FIGURA 21:** Recuperación obtenida de las diferentes triazinas con el tiempo de contacto al cargar una disolución de 10 mg/L en el MIP

Una vez optimizado el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio, se han obtenido las isotermas de adsorción experimentales variando la concentración de cada una de las triazinas cargadas en el MIP. Las recuperaciones obtenidas en cada caso se han ajustado a una isoterma de adsorción mediante el modelo de Langmuir-Freundlich según la ecuación:

$$B = \frac{N_t a F^m}{1 + a F^m}$$

donde **B** representa la cantidad de compuesto enlazada al polímero, **F** la no enlazada, **N<sub>t</sub>** la capacidad, **a** es una medida de la afinidad entre las triazinas y el polímero y **m** es el coeficiente de heterogeneidad.

La evaluación de los parámetros obtenidos para cada una de las triazinas demuestra que la interacción de las triazinas con el polímero impreso está gobernada por dos factores fundamentales: el impedimento estérico y la selectividad hacia el grupo aminoisopropilo. Tal y como se demostró en un trabajo previo [1], el único mecanismo que gobierna la diferente afinidad de un polímero impreso, obtenido mediante un procedimiento en bloque, hacia las diferentes triazinas es el impedimento estérico.



En el polímero impreso obtenido por precipitación es posible distinguir cuatro tipos diferentes de puntos de unión selectivos de las triazinas:

1. Gran cantidad de huecos de reducido tamaño que sólo son capaces de interaccionar con las moléculas más pequeñas (desisopropilatrazina, desetilatrazina). Estos huecos se formarían por la disminución del tamaño de los huecos originales como consecuencia del proceso de eliminación de la plantilla en el Soxhlet.
2. Huecos capaces de interaccionar con todas las triazinas evaluadas.
3. Una pequeña fracción de huecos selectivos hacia moléculas que presenten como mínimo un grupo aminoisopropilo en su estructura, capaces de interaccionar con desetilatrazina, atrazina, propazina y prometrín.
4. Una pequeña fracción de huecos selectivos hacia moléculas que presenten dos grupos aminoisopropilo en su estructura, capaces de interaccionar con propazina y prometrín.

Los resultados obtenidos al cargar cada triazina por separado se han comparado con los resultados obtenidos al cargar una mezcla de triazinas, demostrando la existencia de competencia entre las distintas triazinas por los puntos de unión al polímero. En este sentido, se observa como al cargar una mezcla de las triazinas disminuye drásticamente la capacidad de todas ellas, siendo dicha disminución especialmente importante en el caso de la atrazina y la propazina.

Este trabajo se ha publicado en la revista Journal of Chromatography B bajo el título “*Characterisation and quality assessment of binding sites on a propazine-imprinted polymer prepared by precipitation polymerisation*”. Asimismo, se ha presentado en el congreso MIP2004: Third International Workshop on Molecularly Imprinted Polymers (Cardiff, Reino Unido, 2004).

#### **Bibliografía:**

- [1] E. Turiel, C. Pérez-Conde, A. Martín-Esteban, *Analyst*, **2003**, 128, 137

## Characterisation and quality assessment of binding sites on a propazine-imprinted polymer prepared by precipitation polymerisation

C. Cacho<sup>a</sup>, E. Turiel<sup>b</sup>, A. Martín-Esteban<sup>c,\*</sup>, C. Pérez-Conde<sup>a</sup>, C. Cámara<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria s/n, E-28040 Madrid, Spain*

<sup>b</sup> *Departamento de Química y Materiales, Universidad Europea CEES, Villaviciosa de Odón, E-28670 Madrid, Spain*

<sup>c</sup> *Departamento de Medio Ambiente, INIA, Carretera de A Coruña km 7.5, E-28040 Madrid, Spain*

Received 26 June 2003; received in revised form 17 November 2003; accepted 22 December 2003

### Abstract

In this paper, the Langmuir–Freundlich isotherm (LF) is used to characterise a propazine-imprinted polymer obtained by precipitation polymerisation (MIP-P). Different rebinding studies were carried out allowing to explain the different interactions taking place between the molecularly imprinted polymer and six triazinic herbicides (desisopropylatrazine, desethylatrazine, simazine, atrazine, propazine and prometryn). The LF fitting parameters obtained (total number of binding sites, heterogeneity index and mean binding affinity) were compared to those obtained in a previous work for a propazine-imprinted polymer prepared by bulk polymerisation (MIP-B). From that study, it was concluded that precipitation polymerisation yielded polymers with a more homogeneous binding site distribution and higher affinity constants. © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Precipitation polymerisation; Quality assessment; Molecular imprinting; Propazine

### 1. Introduction

During the last years, molecularly imprinted polymers (MIPs) have been widely used as synthetic materials able to rebind the target analyte (template) for which they have been prepared. From those studies, it has been possible to demonstrate their potential to be used in the analytical chemistry field, especially in those areas where a high degree of selectivity is required such as solid-phase extraction [1], sensors [2,3], chromatography [4] and catalysis [5,6].

MIPs are synthesised by the polymerisation of an appropriate monomer and cross-linker in the presence of the target analyte (the template molecule). Once the polymer is obtained, the template molecule is removed leaving cavities complementary in size and shape to the analyte able to selectively rebind this molecule. However, the typical bulk polymerisation method used is far from ideal as a random shape and size distribution of particles is obtained. In addition,

some authors have reported that the process of crushing and sieving the polymer after polymerisation can break the imprinted sites [7]. Also, a substantial number of the cavities may shrink after the template removal with polar organic solvents [7]. On the other hand, and especially when the non-covalent approach is used, the pre-polymerisation step in which template and monomer have to form a stable complex, is a non-well defined process. As a consequence, complexes with different template:monomer stoichiometry can be formed [8,9] and thus, the obtained MIPs present a heterogeneous binding site distribution limiting their applicability range (i.e. broad peaks in chromatography, non-linear response in sensors) and their selectivity.

In order to overcome these drawbacks, several polymerisation strategies allowing the preparation of spherical particles with a narrow particle size and a more homogeneous binding site distribution have been proposed in the literature [10]. From our point of view, precipitation polymerisation [11] is one of the most easy and well-suited proposed methods to obtain MIP micro-spheres with the desired characteristics. This methodology consists basically in the polymerisation of the mixture (template, monomer and

\* Corresponding author. Tel.: +34-91-347-68-20;  
fax: +34-91-357-22-93.

E-mail address: [amartin@inia.es](mailto:amartin@inia.es) (A. Martín-Esteban).

cross-linker) in the presence of a higher amount of porogen than the typically used in bulk polymerisation method.

Recently, this polymerisation strategy was used to prepare a non-covalent fenuron-imprinted polymer [12], which led to the synthesis of spherical particles ( $\sim 1\ \mu\text{m}$ ) with a homogeneous binding site distribution. This result was remarkable as up to now only covalent MIPs had shown this kind of binding site distribution but not those synthesised using the non-covalent approach. In order to confirm the suitability of this strategy to prepare high quality molecularly imprinted polymers with homogenous binding site distribution, a new polymer using a different template (propazine) was prepared (MIP-P) and evaluated in the present work. Thus, the main aim of this paper is the characterisation and evaluation of the homogeneity of the binding sites of this polymer and to compare the results with those obtained for another non-covalent propazine-imprinted polymer prepared by bulk polymerisation (MIP-B) in a previous work [13]. This study was carried out by equilibrium rebinding experiments of not only propazine (template molecule) but also of other structurally related compounds able to interact with the obtained polymers.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents

Methacrylic acid (MMA), ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) and azobisisobutyronitrile (AIBN) were purchased from Sigma–Aldrich Química S.A. (Madrid, Spain). Atrazine (A), simazine (SIM), propazine (PPZ), prometryn (PMT), desisopropylatrazine (DIA) and desethylatrazine (DEA) were purchased from Riedel de Haen (Seelze, Germany). Stock standard solutions ( $1\ \text{g l}^{-1}$ ) were prepared in toluene and stored at  $-18^\circ\text{C}$ .

Purified water was obtained from a MilliQ water system purchased from Millipore Ibérica S.A. (Madrid, Spain) and HPLC grade solvents (acetonitrile, toluene and methanol) were obtained from Scharlab S.L. (Barcelona, Spain).

### 2.2. Polymer preparation

The preparation of the propazine-imprinted polymers by bulk and precipitation polymerisation was described elsewhere [13,14]. Briefly, the template molecule (propazine, 1 mmol) and the monomer (MMA, 4 mmol) were added to a 25 ml glass tube and left in contact for 5 min. Then, the cross-linker (EDMA, 20 mmol), the initiator (AIBN, 2 mmol) and the porogen (toluene, 5 or 12 ml for bulk or precipitation polymerisation, respectively) were added. The mixture was purged with  $\text{N}_2$  for 5 min and the glass tube was sealed under this atmosphere. Polymerisation was carried out in a thermostated water bath at  $60^\circ\text{C}$  for 24 h, after which the template molecule was removed by Soxhlet extraction with a methanol:acetic acid (1:1) mixture

for about 12 h. The recovery of the template after Soxhlet extraction was around 99% in both imprinted polymers. Non-imprinted polymers were obtained following the same procedure without the addition of the template molecule. Bulk polymer was crushed and sieved before Soxhlet extraction and particles within the 50–105  $\mu\text{m}$  range were selected.

### 2.3. Rebinding experiments

About 100 mg of the polymer particles were placed in an empty solid-phase extraction cartridge. After conditioning with 50 ml of methanol, 50 ml of acetonitrile and 25 ml of toluene, 1 ml of standard solution of each herbicide independently or a mixture of all of them in toluene at a concentration range from 0.05 to  $500\ \text{mg l}^{-1}$  was loaded onto the cartridge. Non-specifically bound triazines were removed by washing with  $5 \times 1\ \text{ml}$  of a toluene:acetonitrile (4:1) mixture, and the analytes were quantitatively eluted with 1 ml of acetonitrile and  $7 \times 1\ \text{ml}$  of methanol. Then, the extract was evaporated to dryness and redissolved in 1 ml of MilliQ water. Loading, washing and elution steps were carried out at a flow-rate of  $1\ \text{ml min}^{-1}$ .

Analyte concentrations in the final solution, representing the amount of analyte bound to the polymer (B), were determined by HPLC-UV as described below. The amount of unbound analyte to the polymer (F) was obtained by subtracting B from that of initial analyte loaded to the polymer.

### 2.4. Chromatographic analysis

All measurements were performed in an HPLC system from Thermo Separation Products consisting of a Constametric 4100 Series high pressure pump, a Spectro Monitor 5000 photo diode-array detector and a Rheodyne 7725i injection valve equipped with a  $100\ \mu\text{l}$  loop. The analytes were separated on a Symmetry<sup>®</sup> Waters C18 column ( $150\ \text{mm} \times 3.0\ \text{mm i.d.}$ ,  $3.5\ \mu\text{m}$ ) using a linear gradient elution as follows: from 70% A (purified water) and 30% B (acetonitrile) to 30% A and 70% B in 25 min, and returning to initial conditions in 5 min. In those experiments where each triazine was analysed independently, isocratic elution using two different mobile phases (70% A:30% B for DIA and DEA, and 50% A:50% B for A, SIM, PPZ and PMT) was used. Triazinic herbicides were monitored at 220 nm and quantified by external calibration using peak area measurements.

### 2.5. Data analysis

Langmuir–Freundlich adsorption isotherms were fitted to the log–log plot of the experimental adsorption isotherms using the solver function in Microsoft Excel 98 by varying the fitting parameters to reach a value of 1 for  $R^2$  as described by Umpleby et al. [15].

### 3. Results and discussion

As was stated in the Introduction, precipitation polymerisation seems to be one of the most suitable methods to prepare imprinted polymers with a homogeneous binding site distribution. In order to confirm this statement, a propazine-imprinted polymer was prepared by precipitation polymerization (MIP-P) and different rebinding experiments were carried out in order to assess the characteristics of this polymer.

Several mathematical models (Langmuir, bi-Langmuir, Freundlich, Toth, Langmuir–Freundlich, etc.) [16] have been used to address the heterogeneity observed in MIPs. From our point of view, Langmuir–Freundlich (LF) isotherm is the more appropriated mathematical model as it is able to describe how adsorption processes take place both in the sub-saturated and saturated zones. In addition, this model allows the direct measurement of the fitting parameters, which can be used either for the comparison of different MIPs [15] or to study the adsorption of different compounds to the same molecularly imprinted polymer [13].

The LF isotherm describes a relationship between the concentration of bound (B) and free (F) guest in heterogeneous systems with three different coefficients according to the following equation:

$$B = \frac{N_t a F^m}{1 + a F^m} \quad (1)$$

where  $N_t$  is the total number of binding sites,  $a$  is related to the median binding affinity constant  $K_o$  ( $K_o = a^{1/m}$ ), and  $m$  is the heterogeneity index, which will be equal to 1 for a homogeneous material, or will take values within 0 and 1 if the material is heterogeneous.

It is important to point out that conclusions derived from a rebinding experiment may only be accurate if the system studied is under equilibrium conditions and if analytes are only specifically bound to the polymer. Therefore, both equilibrium conditions and non-specific interactions have to be studied. Non-specific interactions were firstly evaluated in previous papers [13,14] by loading onto the corresponding non-imprinted polymer 1 ml toluene solution containing all the triazines under study (Fig. 1) and testing different toluene:acetonitrile mixtures as washing solutions. It was concluded that 20% of acetonitrile in toluene was enough to quantitatively remove non-specifically bound compounds from both non-imprinted polymers prepared by bulk (NIP-B) and precipitation (NIP-P) polymerisation, respectively.

In order to assess equilibrium, mixtures of polymer particles (about 100 mg) and 1 ml toluene solution containing  $10 \text{ mg l}^{-1}$  of each triazine were kept in contact for 15, 30, 45, 60 and 120 min, in independent experiments, at room temperature in solid-phase extraction cartridges. After this incubation, the polymer was washed with  $5 \times 1 \text{ ml}$  toluene:acetonitrile (4:1) and the analytes were quantitatively eluted with 1 ml acetonitrile and  $7 \times 1 \text{ ml}$  methanol and B calculated as described in Section 2. A parallel

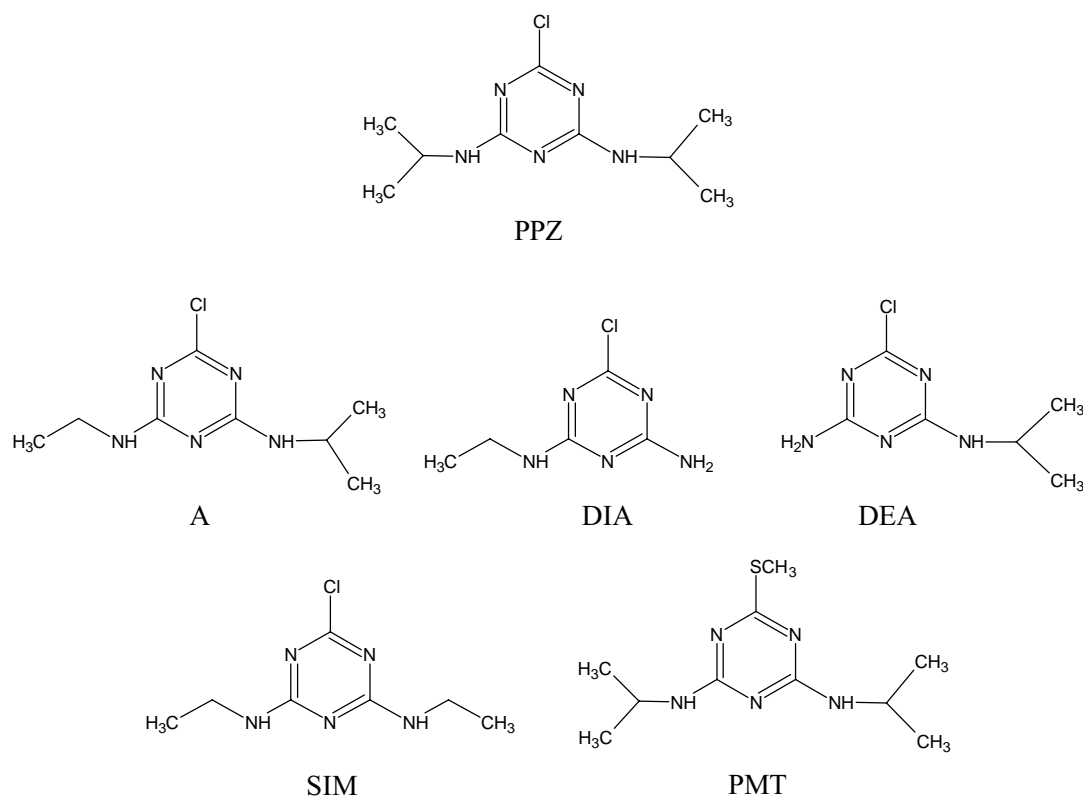


Fig. 1. Chemical structures of the selected triazines.

experiment loading the toluene solution containing analytes at  $1 \text{ ml min}^{-1}$  (incubation time = 0) was also performed. The obtained results were compared each other and not significant differences were found between the B values obtained for the different periods of incubation, which means that equilibrium was immediately reached. This result clearly indicates that diffusion mass transfer is very fast, which, in principle, would allow the use of these polymers as a chromatographic stationary phase. However, it is important to stress that the behaviour of the polymers studied herein cannot be extended to other imprinted polymers as it is known that the template used during polymerisation affects some of the physical properties (i.e. porosity) of the obtained polymers.

### 3.1. Rebinding experiments

To perform this study, solutions of each herbicide at concentration ranging between  $0.05$  and  $75 \text{ mg l}^{-1}$  were loaded independently onto the cartridge filled with the

imprinted-polymer (MIP-P) and B and F were calculated as described in Section 2. The obtained data were initially compared to those obtained using a propazine-imprinted polymer prepared by bulk polymerisation (MIP-B), in order to evaluate the influence of the polymerisation strategy on the quality of the obtained binding sites.

#### 3.1.1. MIP-P versus MIP-B

Fig. 2 shows the experimental adsorption isotherms of each triazine in the propazine-imprinted polymer prepared by precipitation polymerisation (MIP-P) and the corresponding fitting LF isotherms. Table 1 shows the corresponding fitting coefficients together to those obtained in the previous study [13] using a propazine-imprinted polymer prepared by bulk polymerisation (MIP-B). The accuracy of these fitting parameters is assessed by the low relative standard error obtained for the fitting analysis (around 5% in all cases), and by the wide concentration range in which measurements were made, including both saturated and subsaturated zone. The validity of this range is demonstrated by the fact that the

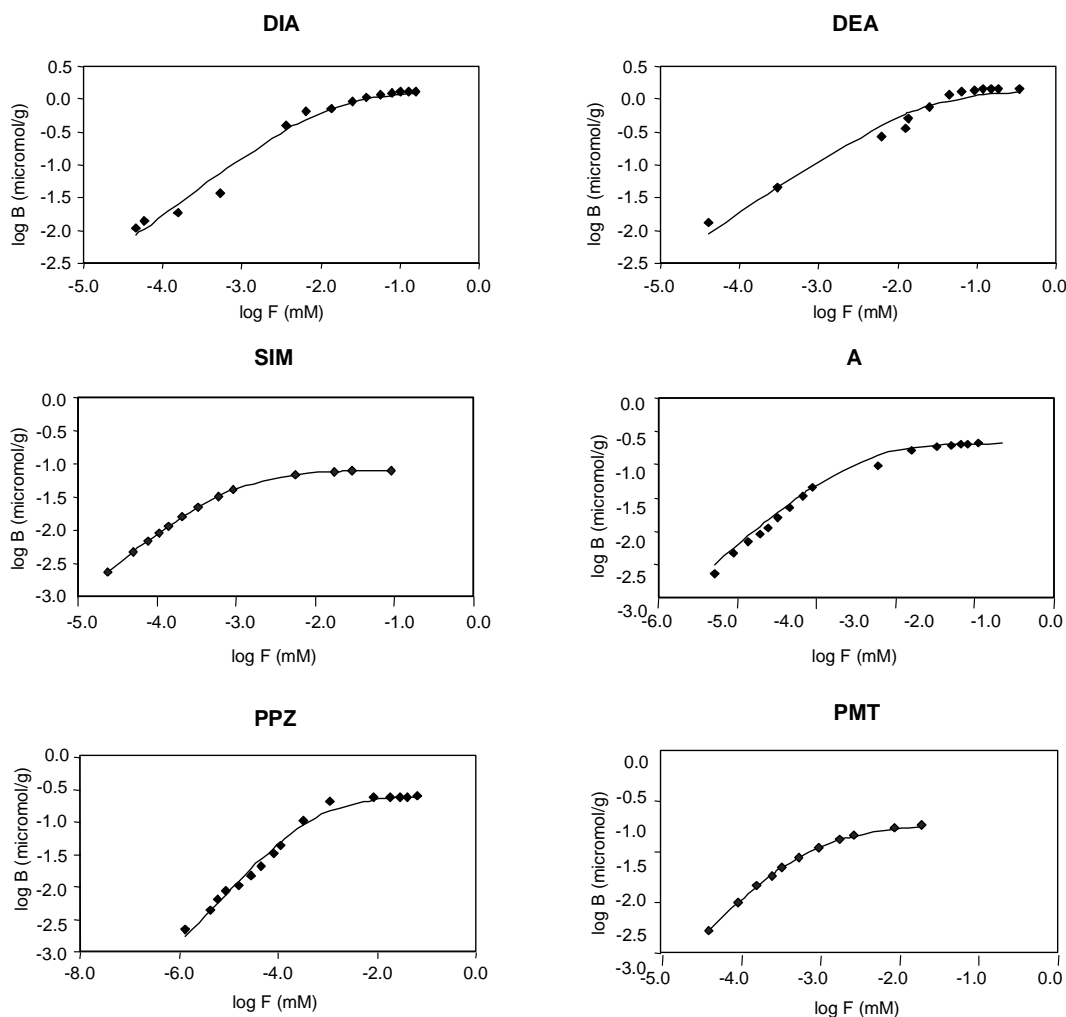


Fig. 2. Log plots of the adsorption isotherms for studied analytes in MIP-P. The experimental data (◆) were fit to Langmuir–Freundlich isotherm (solid line).



Table 1

Binding parameters obtained for LF fit to the experimental adsorption isotherms of studied triazines in two propazine-imprinted polymers obtained by precipitation (MIP-P) and bulk (MIP-B) polymerisation<sup>a</sup>

Triazine	MIP-P					MIP-B				
	$N_t$ ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ )	$a$ ( $\text{mM}^{-1}$ )	$m$	$K_o$ ( $\text{mM}^{-1}$ )	$K$ limits ( $\text{mM}^{-1}$ ) <sup>b</sup>	$N_t$ ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ )	$a$ ( $\text{mM}^{-1}$ )	$m$	$K_o$ ( $\text{mM}^{-1}$ )	$K$ limits ( $\text{mM}^{-1}$ ) <sup>b</sup>
DIA	1.350	58.2	0.92	84.6	6–21687	0.530	8.8	0.65	27.9	11.2–34750
DEA	1.450	17.3	0.81	48.2	3–25333	0.511	8.4	0.65	26.4	3.4–8934
Simazine	0.079	1144.5	0.99	1201.9	10–41666	0.185	6.7	0.51	41.6	4.7–134400
Atrazine	0.214	325.1	0.84	978.6	14–143678	0.188	32.0	0.81	69.3	5.2–30812
Propazine	0.249	344.6	0.80	1484.1	14–758333	0.181	42.9	0.84	86.2	4.4–17271
Prometryn	0.019	545.1	0.85	1656.4	53–25368	0.018	85.6	1.00	85.6	26.5–6630

<sup>a</sup> The correlation coefficient  $R^2$  was higher than 0.980 in all cases.

<sup>b</sup> Calculated from the experimental maximum and minimum free analyte concentration ( $F_{\text{max}}$  and  $F_{\text{min}}$ ) by the relationships  $K_{\text{max}} = 1/F_{\text{min}}$  and  $K_{\text{min}} = 1/F_{\text{max}}$ .

obtained  $K_o$  values fall within the limits  $1/F_{\text{max}}$  and  $1/F_{\text{min}}$  (calculated from the experimental maximum and minimum free analyte concentration  $F_{\text{max}}$  and  $F_{\text{min}}$ ) as it is required for the LF model.

Several conclusions may be derived from the comparison of the parameters obtained for both polymers. Firstly, it is clear that the capacity of the MIP-P is higher than that of the MIP-B. These results can be attributed to the breakage of some of the binding sites present in the polymeric matrix during the crushing and sieving steps necessary in the preparation of MIP-B. However, the capacity obtained for both polymers is much lower than the theoretic maximum capacity ( $\sim 400 \mu\text{mol g}^{-1}$ ), which can be calculated taking into account the amount of template used during polymerisation and the amount of polymer obtained. This fact suggests that the main responsible step of imprinted sites destruction is the Soxhlet extraction of the template with polar organic solvents, since this procedure has been used in both cases.

On the other hand, it is remarkable how the MIP-P presents much higher affinity constants for all the triazines tested than those obtained when bulk polymerisation was carried out. This result can only be attributed to the presence of better-defined binding sites that would be able to strongly interact with the triazines loaded on MIP-P. In addition, as it was expected, MIP-P presents a much more homogeneous binding site distribution than that shown by MIP-B. Thus, apparently, precipitation polymerisation may prevent the formation of complexes of different template:monomer stoichiometry (one of the reported reasons for the observed heterogeneity of non-covalent MIPs) during the pre-polymerisation step, as this step is carried out in a very dilute system.

However, the heterogeneity indexes obtained in MIP-P are slightly lower than 1, whereas a perfect homogeneous binding site distribution ( $m = 1$ ) was observed in a previous study with a fenuron-imprinted polymer. This polymer was prepared using the same experimental conditions than MIP-P [12] but with the only difference of the template employed. Fig. 3 shows the scanning electronic micrographs of both imprinted polymers using fenuron (Fig. 3A)

or propazine (Fig. 3B) as templates obtained by precipitation polymerisation. It is clear that for the fenuron imprinted polymer, discrete uniformly sized micro-spheres ( $\sim 1 \mu\text{m}$ ) were obtained, whereas MIP-P consisted of agglomerates of different sizes formed by those particles ( $\sim 1 \mu\text{m}$ ). The different polymer morphology, which can only be attributed to the different template used, could explain the different degree of binding site homogeneity presents in both polymers. In addition, this result makes questionable the suitability of precipitation polymerisation strategy for the direct synthesis of uniformly sized micro-spheres since clearly the template used has a direct influence on the final morphology of the obtained polymer. Thus, further research on precipitation polymerisation should be done using other template molecules (with differences in size, shape and chemical structure) in order to establish a link between the template used and the final polymer morphology obtained.

### 3.1.2. Characterisation of the binding sites present in MIP-P

Apart from these considerations on the polymer morphology, it is still crucial to understand how molecular

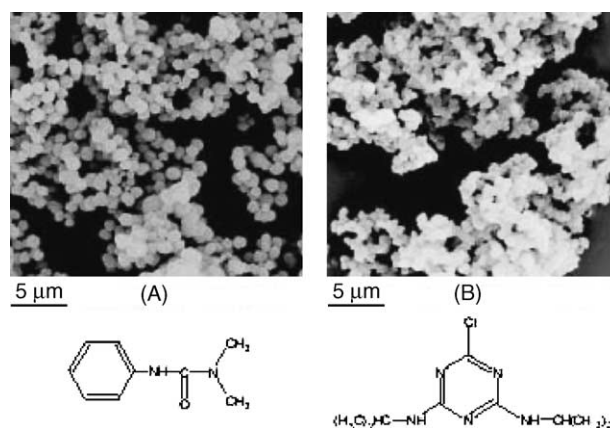


Fig. 3. Scanning electron micrographs of fenuron- (A) and propazine- (B) imprinted polymers obtained by precipitation polymerisation and the corresponding chemical structures of the templates used.



recognition takes place in MIPs in order to improve their quality in the future. In the previous study on the performance of the MIP-B carried out by our group [13], it was demonstrated that the LF isotherm fitting coefficients obtained can be used to establish the kind of binding sites present in MIPs. In such study, it was concluded that the recognition mechanism in MIP-B was mainly governed by the molecular size but apparently slight structural differences (presence of an aminoethyl or an aminoisopropyl group) did not play an important role. However, and according to the fitting coefficients obtained in the MIP-P for the selected triazines, an identical behaviour cannot be assigned in this case, although some similarities can be found. For instance, it is clear that molecular size has also a direct influence in the recognition mechanism of MIP-P, since bigger molecules are unable to access all the binding sites present in the polymer. In this sense, prometryn shows the lower capacity of the compounds tested, due to the bigger size of the thiomethyl group present in its structure compared to that of the chlorine atom, preventing its access to certain binding sites (see triazinic structure in Fig. 1). Similarly, molecular size can also justify the higher capacity obtained for the smaller compounds (DIA and DEA) that would be able to rebind those sites shrunk during the Soxhlet extraction of the template molecule, not accessible for the other triazines.

However, the clearest difference in the recognition of triazines by both polymers was found in the case of simazine. Firstly, and according to the value obtained for the coefficient  $m$  of simazine in MIP-P, it can be concluded that this analyte can only interact with one kind of binding site. On the other hand, the capacity obtained for simazine in this polymer is rather lower than those of atrazine and propazine. This did not occur in the case of MIP-B, suggesting that structural differences relating to the presence of an aminoisopropyl or aminoethyl group in the triazine molecule are more important in the recognition mechanism in MIP-P. According to results obtained for SIM, A and PPZ, different binding sites with different degrees of structural selectivity can be defined in MIP-P. One kind of triazinic-structure selective sites able to interact with any of the triazines tested, regardless of whether an aminoethyl or an aminoisopropyl group were present; and a second kind of more selective sites in which only the triazines with at least one aminoisopropyl group in their structure (therefore excluding simazine) could interact. Additionally, the slightly higher capacity observed for propazine compared to atrazine suggests the presence of a small fraction of specific binding sites where only those analytes with two aminoisopropyl groups in their structure could interact (PPZ and PMT in some extent).

To summarise, according to both steric effects and the selectivity observed, four different kinds of binding sites can be distinguished in MIP-P. On the one hand, there would be a large amount of small binding sites where only the smallest triazines (DIA and DEA) would be able to interact. The

three other kinds of binding sites present in the polymeric matrix would be a consequence of the difference in MIP-P selectivity for aminoethyl or aminoisopropyl groups in the triazinic structure.

### 3.1.3. Rebinding experiments of mixtures of triazines

In order to evaluate how analytes compete for the binding sites present in this polymer, rebinding experiments using mixtures containing all the triazines studied were carried out according to the procedure described in Section 2. The B and F experimental values were fitted to the LF isotherm and the binding coefficients obtained are shown in Table 2. As it was expected, the obtained capacities in this second study are lower than those obtained when the triazines were loaded independently, due to competition between the different triazines for the binding sites present in the polymer. However, this diminishment on the capacities did not occur in the same rate for all the triazines. As can be observed in Table 2, DIA and DEA suffered the lower diminishment, suggesting that these analytes were less displaced during the competition.

These results can be explained taking into account that DIA and DEA compete only with each other for the smaller binding sites, to which the other triazines cannot access. But also, the huge decrease on the capacities of the other triazines, especially in the case of atrazine and propazine, suggest that DIA and DEA are able to displace them from the other binding sites, despite that lower  $K_o$  values were obtained for these analytes (Table 1). However, it is important to stress that  $K_o$  represents an average of the strength of the interaction between a given analyte and the polymer. Thus, this behaviour may suggest that the strength of interaction of DIA and DEA with some binding sites may be higher than those of the other triazines for the same binding sites. Obviously, the amount of this kind of binding sites would be very low and thus the  $K$  values associated to them would have a minor influence in the calculation of  $K_o$ .

Table 2

Binding parameters obtained for LF fit to the experimental adsorption isotherms of studied triazines loaded simultaneously in a propazine-imprinted polymer obtained by precipitation polymerisation (MIP-P)<sup>a</sup>

Triazine	$N_t$ ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ )	$a$ ( $\text{mM}^{-1}$ )	$m$	$K_o$ ( $\text{mM}^{-1}$ )	$K$ limits ( $\text{mM}^{-1}$ ) <sup>b</sup>
DIA	0.901	64.05	0.95	80.4	0.2–43300
DEA	0.867	21.06	0.81	42.3	0.3–62500
Simazine	0.028	1140	0.97	1442	0.2–22400
Atrazine	0.028	1135	0.97	1445	0.2–25200
Propazine	0.026	479	0.82	1856	0.2–50000
Prometryn	0.006	553	0.81	2430	0.2–12600

<sup>a</sup> The correlation coefficient  $R^2$  was higher than 0.980 in all cases.

<sup>b</sup> Calculated from the experimental maximum and minimum free analyte concentration ( $F_{\text{max}}$  and  $F_{\text{min}}$ ) by the relationships  $K_{\text{max}} = 1/F_{\text{min}}$  and  $K_{\text{min}} = 1/F_{\text{max}}$ .

#### 4. Conclusions

In this paper, it has been demonstrated that a careful observation of the binding parameters obtained from Langmuir–Freundlich fitted isotherms allows to characterise the binding sites present in imprinted polymers as well as to assess the observed cross-reactivity. Based on that methodology, it has been possible to confirm that precipitation polymerisation yields polymers with a more homogeneous binding site distribution and higher affinity constants compared to those obtained by bulk polymerisation using two different propazine-imprinted methacrylic-based polymers as models. However, unexpected morphology of the polymer prepared by precipitation polymerisation was observed making questionable the ability of this polymerisation strategy for the synthesis of molecularly imprinted uniformly-sized micro-spheres.

On the other hand, taking into account all the considerations commented along this paper, MIP-P could be an appropriated material to be used as stationary phase in HPLC because of its highly homogeneous binding sites distribution and the fast diffusion mass transfer. Thus, further research should be done in order to confirm the ability of MIPs to be used as highly selective stationary phases in chromatography.

#### Acknowledgements

The authors wish to thank DGICYT (BQU2003-01348) for financial support and Beatrice Gracias for revising the manuscript. A. Martin-Esteban acknowledges a Ramon y

Cajal contract from the Spanish Ministry of Science and Technology.

#### References

- [1] A. Martin-Esteban, Fresenius' J. Anal. Chem. 370 (2001) 795.
- [2] S.A. Piletsky, A.P.F. Turner, Electroanalysis 14 (2002) 317.
- [3] K. Haupt, Chem. Commun. 2 (2003) 171.
- [4] B. Sellergren, J. Chromatogr. A 906 (2001) 227.
- [5] G. Wulff, Chem. Rev. 102 (2002) 1.
- [6] C. Alexander, L. Davidson, W. Hayes, Tetrahedron 59 (2003) 2025.
- [7] G. Wulff, T. Gross, R. Schonfeld, T. Schrader, C. Kristen, in: R.A. Bartsch, M. Maeda (Eds.), Molecular and Ionic Recognition with Imprinted Polymers, American Chemical Society, Washington, DC, 1998 (Chapter 2).
- [8] H.S. Andersson, J.G. Karlsson, S.P. Piletsky, A.-C. Koch-Schmidt, K. Mosbach, I.A. Nicholls, J. Chromatogr. A 848 (1999) 39.
- [9] I.A. Nicholls, K. Adbo, H.S. Andersson, P.O. Andersson, J. Ankarloo, J. Hedin-Dahlström, P. Jokela, J.K. Karlsson, L. Olofsson, J. Rosengren, S. Shoravi, J. Svenson, S. Wikman, Anal. Chim. Acta 435 (2001) 9.
- [10] A.G. Mayes, in: B. Sellergren, Molecularly Imprinted Polymers: Man-Made Mimics of Antibodies, Their Application in Analytical Chemistry, Elsevier, Amsterdam, 2001 (Chapter 12).
- [11] L. Ye, P.A.G. Cormack, K. Mosbach, Anal. Commun. 36 (1999) 35.
- [12] F.G. Tamayo, J.L. Casillas, A. Martin-Esteban, Anal. Chim. Acta 482 (2003) 165.
- [13] E. Turiel, C. Perez-Conde, A. Martin-Esteban, Analyst 128 (2003) 137.
- [14] C. Cacho, E. Turiel, A. Martin-Esteban, C. Perez-Conde, C. Camara, Anal. Bioanal. Chem. 376 (2003) 491.
- [15] R.J. Umpleby II, S.C. Baxter, Y. Chen, R.N. Shah, K.D. Shimizu, Anal. Chem. 73 (2001) 4584.
- [16] B. Sellergren, in: B. Sellergren, Molecularly Imprinted Polymers: Man-Made Mimics of Antibodies and Their Application in Analytical Chemistry, Elsevier, Amsterdam, 2001 (Chapter 5).



# MIP2004: Third International Workshop on Molecularly Imprinted Polymers Cardiff, Reino Unido, 2004



## COMPARISON OF THE BINDING SITES DISTRIBUTION IN PROPAZINE-IMPRINTED POLYMERS PREPARED BY BULK AND PRECIPITATION POLYMERISATION

C. Cacho, E. Toriel, A. Martín-Esteban\*, C. Pérez-Conde and C. Cámara  
Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain  
\*Departamento de Medio Ambiente, INIA, 28040, Madrid, Spain

### INTRODUCTION

Molecularly imprinted polymers are synthetic materials able to selectively rebinding the analyte involved in their preparation. However, the typical bulk polymerisation is far from ideal, as a random shape and size distribution of particles is obtained. Precipitation polymerisation has been proposed as one of the easiest and well-suited methods to overcome these drawbacks.

In the present work, two methacrylic acid-based imprinted polymers obtained by either bulk (MIP-B) or precipitation (MIP-P) polymerisation are compared. The Langmuir-Freundlich isotherm is used to characterise each polymer in terms of total number of binding sites, media binding affinity and heterogeneity. Different rebinding studies allowed the explanation of the different interactions taking place between the polymers and six triazine herbicides (Fig. 1).

### POLYMERISATION CONDITIONS

	Name	Bulk polymer	Precipitation polymer
Template	Propazine	1 mmol	1 mmol
Monomer	Methacrylic acid	4 mmol	4 mmol
Cross-linker	Ethylene glycol dimethacrylate	20 mmol	20 mmol
Initiator	Acrylic nitrobenzene	0.5 mmol	0.5 mmol
Porogen	Toluene	3 mL	12 mL

Thermopolymerisation at 70°C for 18 hours

Soxhlet extraction: HAc:MeOH (1:1) for 10 hours

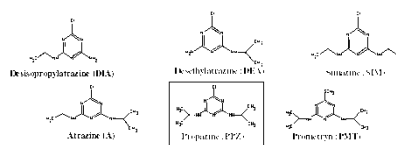


Fig. 1.- Structures of the triazines studied

### OPTIMA MSPE PROCEDURES

	Load	Washing solution	Elution
MIP-B	1 ml Toluene	50 ml AcN:Toluene (15:85)	80 ml AcN
MIP-P	1 ml Toluene	50 ml AcN:Toluene (20:80)	1 ml AcN+70 ml MeOH

Equilibrium is immediately reached for both polymers

### REBINDING EXPERIMENTS

About 100 mg of MIP-P and MIP-B were placed in SPE cartridges. After conditioning with 50 mL methanol, 50 mL acetonitrile and 25 mL toluene, 1 mL of standard solution of each herbicide independently or a mixture of all of them in toluene at a concentration range of 0.05 to 500 ng/L was loaded onto the cartridges.

Analyte concentrations in the final solution, representing the amount of analyte bound to the polymer (B) were determined by HPLC-UV in the extracts. The amount of unbound analyte (F) was obtained by subtracting B from that of initial analyte loaded on the polymer. Experimental adsorption isotherms were fitted by Langmuir-Freundlich adsorption model (Eq. 1) in order to estimate the total number of binding sites ( $N$ ), the median binding affinity constant ( $K_d$ ) and the heterogeneity index ( $m$ ). These parameters allowed the comparison of both MIP-B and MIP-P.

$$B = \frac{N \cdot a F^m}{1 + a F^m} \quad (Eq. 1)$$

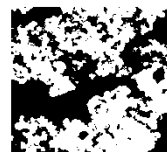


Fig. 2.- Scanning electron micro-graph of MIP-P

Table 1: Binding parameters obtained for Langmuir-Freundlich fit to the experimental adsorption isotherms of studied triazines loaded independently in two propazine-imprinted polymers (MIP-P and MIP-B).

	MIP-P				MIP-B			
Triazine	N (μmol/g)	a (mM <sup>-1</sup> )	m	K <sub>d</sub> (mM <sup>1/m</sup> )	N (μmol/g)	a (mM <sup>-1</sup> )	m	K <sub>d</sub> (mM <sup>1/m</sup> )
DEA	1.350	58.2	0.92	64.6	0.530	8.6	0.66	27.9
DEA	1.450	17.3	0.81	48.2	0.511	8.4	0.66	26.4
Simazine	0.059	1144.3	0.99	1201.9	0.185	6.2	0.51	41.6
Atrazine	0.214	325.1	0.84	938.6	0.188	32.0	0.81	69.3
Propazine	0.249	344.6	0.80	1464.1	0.181	42.9	0.84	86.2
Prometryn	0.019	545.1	0.85	1656.4	0.016	85.6	1.00	85.6

Table 2: Binding parameters obtained for Langmuir-Freundlich fit to the experimental adsorption isotherms of studied triazines loaded simultaneously in two propazine-imprinted polymers (MIP-P and MIP-B).

	MIP-P				MIP-B			
Triazine	N (μmol/g)	a (mM <sup>-1</sup> )	m	K <sub>d</sub> (mM <sup>1/m</sup> )	N (μmol/g)	a (mM <sup>-1</sup> )	m	K <sub>d</sub> (mM <sup>1/m</sup> )
DEA	0.901	64.05	0.95	80.4	0.301	15.541	1.00	15.541
DEA	0.862	21.06	0.81	42.3	0.285	14.495	0.99	14.632
Simazine	0.028	1140	0.97	1442	0.043	92.113	1.00	92.113
Atrazine	0.028	1135	0.97	1445	0.044	103.332	0.98	113.364
Propazine	0.026	479	0.82	1856	0.043	92.646	0.97	106.272
Prometryn	0.006	553	0.81	2430	0.010	74.951	0.90	121.664

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank DGICYT (BQU2002-01348), Programa Nacional de Alimentación 2000-2003 (CAL01-006), CAM and the Spanish Ministry of Science and Technology for financial support.

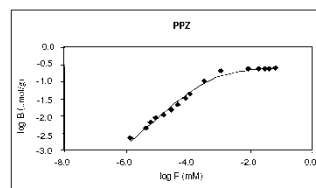


Fig. 3.- Log-log plot of the adsorption isotherm for propazine in MIP-P

### CONCLUSIONS

- Precipitation polymerisation yields polymers with a more homogeneous binding site distribution and higher affinity constants compared with those obtained by bulk polymerisation.
- The mechanism for the interaction of triazines with molecularly imprinted polymers depends on the polymerisation method.
- There is a direct competition between the triazines for the binding sites present in the polymeric matrix when they are loaded simultaneously on the MIPs.
- MIP-P might be an appropriated material to be used as a stationary phase in HPLC because of its highly homogeneous binding sites distribution and the fast diffusion mass-transfer.





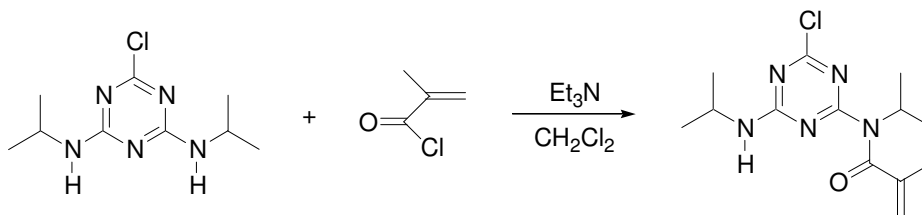
### *3. EMPLEO DE POLÍMEROS IMPRESOS SEMI-COVALENTES PARA LA DETERMINACIÓN DE TRIAZINAS EN MUESTRAS COMPLEJAS Y SU CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA*





El objetivo de este trabajo ha sido la obtención de un polímero impreso semi-covalente para triazinas que mejorara las características físico-químicas del polímero descrito en el capítulo anterior.

La plantilla utilizada para llevar a cabo la síntesis del polímero ha sido metacrilato de propazina. Dicho compuesto se ha sintetizado por reacción entre ácido metacrílico y propazina en presencia de trietilamina y diclorometano, como se describe a continuación:



La extensión de esta reacción se ha seguido mediante cromatografía en capa fina y el producto final se ha caracterizado mediante resonancia magnética nuclear y espectroscopia de infrarrojos.

Tras la purificación del producto final mediante sucesivas etapas de extracción líquido-líquido con una disolución de NaOH (2%) y agua, se añade el entrecruzante (etilenglicol dimetacrilato), el iniciador (azo-bisisobutironitrilo) y el porogen (tolueno) para que comience la polimerización, que tiene lugar a 60°C. Una vez sintetizado el polímero impreso, la propazina se elimina por la hidrólisis básica del enlace amida con una disolución de NaOH (2M):MeOH (70:30, v/v).

Paralelamente, se han sintetizado cuatro polímeros no impresos (**CP-1** a **CP-4**) con el objetivo de determinar cuál de ellos nos permitirá evaluar mejor las interacciones inespecíficas que pueden tener lugar entre las triazinas y el polímero impreso. Los polímeros **CP-1** y **CP-3** no se han sometido a la etapa de hidrólisis básica con la disolución de NaOH:MeOH. Ambos polímeros difieren en el monómero empleado para su síntesis, ya que el polímero no impreso **CP-1** emplea metacrilato de propazina y el **CP-3** metacrilato de metilo.



Por otro lado y, con el objeto de evaluar el efecto que tiene la etapa de hidrólisis básica sobre el polímero, el polímero no impreso **CP-4** se ha sintetizado empleando metacrilato de metilo como monómero y se ha sometido al mismo procedimiento de hidrólisis que se aplica sobre el polímero impreso para eliminar la plantilla.

Por último, el polímero no impreso **CP-2** se ha sintetizado en ausencia de monómero, siendo el único monómero presente el etilenglicol dimetacrilato, debido a que en el polímero impreso los restos metacrilato deben teóricamente estar situados en el interior de los huecos. Este polímero, al igual que el **CP-4**, se ha sometido al mismo tratamiento con NaOH (2M):MeOH.

Para evaluar qué polímero no impreso representa mejor las interacciones inespecíficas de la propazina con el polímero impreso, se han realizado diferentes estudios comparando el funcionamiento de los distintos polímeros cuando se emplean distintas disoluciones de lavado. El compuesto seleccionado para realizar el estudio ha sido el isotroturón, debido a que este compuesto presenta una polaridad y tamaño similares a los de la propazina y, por lo tanto es de esperar que presente unas interacciones inespecíficas similares. De esta forma, el polímero no impreso más representativo de las interacciones inespecíficas será aquél que presente un comportamiento más parecido al del MIP, ya que éste sólo interacciona con el isotroturón a través de uniones inespecíficas.

Las diferencias observadas en el comportamiento entre los polímeros no impresos que no se han sometido a la etapa de hidrólisis básica (**CP-1** y **CP-3**) y el polímero impreso sólo puede atribuirse a cambios estructurales de la matriz polimérica durante el proceso de hidrólisis. Por otro lado, con respecto a los polímeros no impresos que se han sometido a la etapa de hidrólisis, el polímero **CP-4** muestra un comportamiento más parecido al MIP que el **CP-2**, por lo que dicho polímero se seleccionó como el más representativo de las interacciones inespecíficas.

Una vez seleccionado el polímero no impreso **CP-4** como polímero blanco representativo, se han optimizado las condiciones de carga, lavado y elución, de forma





que se maximice la recuperación de las distintas triazinas en el polímero impreso y se minimice en el polímero no impreso, eliminando de esta forma las interacciones inespecíficas de las triazinas con los polímeros.

En las condiciones óptimas de carga (*tolueno*), lavado (*5x1 mL de una disolución de acetonitrilo:tolueno 1:19*) y elución (*1 mL de acetonitrilo y 2x1 mL de ácido acético:metanol 1:19*), el MIP es capaz de reconocer selectivamente tanto al analito plantilla como a otras triazinas con una estructura similar (simazina, atrazina, desisopropilatrazina y desetilatrazina). La recuperación de dichas triazinas en el polímero no impreso en estas condiciones es inferior a un 10% en todos los casos, lo que demuestra la minimización de las interacciones inespecíficas en las condiciones optimizadas. Con este polímero se ha obtenido una importante mejora de las propiedades físico-químicas, al incrementarse tanto la homogeneidad de los puntos de unión como la capacidad del polímero.

El método de extracción en fase sólida optimizado se ha aplicado con éxito a la limpieza de extractos de muestras de suelo y muestras vegetales complejas tales como maíz y patatas, permitiendo eliminar en una única etapa de lavado la mayor parte de los componentes de dicha matriz que interferían en el análisis de las triazinas. De esta forma, ha sido posible cuantificar las diferentes triazinas mediante HPLC-UV a niveles de concentración inferiores al límite máximo de residuos legislado (20-50 ng/g).

Este trabajo se ha publicado en la revista *Journal of Chromatography A* bajo el título “*Semi-covalent imprinted polymer using propazine methacrylate as template molecule for the clean-up of triazines in soil and vegetable samples*”. Asimismo, se ha presentado en los congresos:

- Euroanalysis XIII (Salamanca, 2004)
- XI Jornadas de Análisis Instrumental (Barcelona, 2005)

# Semi-covalent imprinted polymer using propazine methacrylate as template molecule for the clean-up of triazines in soil and vegetable samples<sup>☆</sup>

C. Cacho<sup>a</sup>, E. Turiel<sup>b</sup>, A. Martín-Esteban<sup>b</sup>, D. Ayala<sup>c</sup>, C. Pérez-Conde<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria s/n, E-28040 Madrid, Spain*

<sup>b</sup> *Departamento de Medio Ambiente, INIA, Carretera de A Coruña Km. 7.5, E-28040 Madrid, Spain*

<sup>c</sup> *Departamento de Química y Materiales, Universidad Europea de Madrid, Villaviciosa de Odón, E-28670 Madrid, Spain*

Received 14 December 2005; received in revised form 15 February 2006; accepted 17 February 2006

Available online 10 March 2006

## Abstract

A semi-covalent imprinted polymer was prepared by precipitation polymerisation using propazine methacrylate as template molecule, ethylene glycol dimethacrylate as cross-linker and toluene as porogen. After removal of propazine by basic hydrolysis of the covalent bond, the optimum loading, washing and elution conditions for the solid-phase extraction of the selected triazines were established. The binding sites present in the polymeric matrix were characterised by fitting the experimental results of several rebinding studies to the Langmuir–Freundlich isotherm. Subsequently, an analytical methodology based on molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) was developed for the determination of several triazinic herbicides in soil and vegetable samples. Following this procedure, a good degree of clean-up of the sample extracts was easily achieved, allowing the HPLC–UV determination of selected triazines in complex samples at low concentration levels.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Molecularly imprinted solid-phase extraction; Semi-covalent imprinted polymer; Triazines; Soil samples; Vegetable samples

## 1. Introduction

During the last years, molecularly imprinted polymers (MIPs) have been successfully used as selective sorbents in solid-phase extraction, so called molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE). Due to the inherent selectivity provided by these materials, MIPs have been considered by scientific community as powerful sorbents for the extraction and clean-up of target analytes in complex samples [1–4]. MIPs are cross-linked synthetic polymers obtained by copolymerising a monomer with a cross-linker in the presence of a template molecule. After polymerisation, the template is removed from the porous network by washing, leaving cavities in the polymeric matrix that are complementary in size, shape and chemical functionality to the template. Thus, when a sample is loaded onto

a MIP in a typical solid-phase extraction procedure, the polymer is able to selectively rebind the analyte (e.g. the template). Thereafter, the analyte is eluted from the cartridge ideally free of co-extracted compounds.

Three different approaches to prepare MIPs have been reported: non-covalent, covalent and semi-covalent approaches. Non-covalent approach, introduced by Arshady and Mosbach [5], is based on the formation of relatively weak non-covalent interactions (e.g. hydrogen bonding) between selected monomers and template molecule before polymerisation. This approach is by far the most used for the preparation of MIPs due to its experimental simplicity (just it is necessary to mix template and monomers in a suitable solvent) and to the availability of a huge variety of monomers able to interact with almost any kind of template. However, it is not free of some drawbacks since the pre-polymerisation step is a non-well defined process, leading to the formation of complexes with different template:monomer stoichiometry, which may lead to different binding sites. In addition, since the template–monomer interactions are governed by an equilibrium process, a high

<sup>☆</sup> Presented at the 11th Meeting on Instrumental Analysis, Barcelona, 15–17 November 2005.

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 3944219; fax: +34 91 3944329.  
E-mail address: [cpconde@quim.ucm.es](mailto:cpconde@quim.ucm.es) (C. Pérez-Conde).

amount of monomer is used in order to displace the equilibrium to form the template–monomer complex. Consequently, the excess of free monomers, randomly incorporated to the polymeric matrix, leads to the formation of non-selective binding sites. In this sense, some authors have reported some difficulties in the chromatographic determination of target compounds after MISPE due to the co-extraction of some matrix components [6–9], or even the loss of MIP performance after use due to matrix compounds were strongly bound to the polymeric matrix [10,11]. These drawbacks might be partially solved by a careful optimisation of washing and/or conditioning steps [6,7,10] or circumvented by introducing a previous clean-up step using a non-imprinted polymer, so called two-step MISPE [9,11]. Obviously, both methodologies increase the analysis time and thus a better definition of the pre-polymerisation step to provide imprinted polymers with less non-specific interactions would be desirable which theoretically can be achieved by synthesising imprinted polymers following the covalent or semi-covalent approaches.

Covalent approach, introduced by Wulff and Sarchan [12], involves the formation of reversible covalent bonds between the template and monomers before polymerisation. Then, the template is removed from the polymer by cleavage of the corresponding covalent bonds, which are re-formed upon rebinding of the analyte. It is clear that the high stability and definition of template–monomer interaction provided by the covalent bonds during polymerisation will lead to a more homogenous population of binding sites minimising the existence of non-specific sites. However, this approach is rather restrictive as it is not easy to design an appropriate template–monomer complex in which covalent bond formation and cleavage are readily reversible under mild conditions. In contrast, the semi-covalent approach, attributed to Whitcombe et al. [13], offers an intermediate alternative in which the template is bound covalently to a functional monomer, as in the covalent approach, but the template rebinding is based only on non-covalent interactions.

Keeping these comments in mind, the main aim of this work was to develop a semi-covalent MISPE procedure useful for the determination of triazines at concentration levels below the established maximum residue limits (MRLs) by current legislation [14] in those samples (e.g. potato, corn, soil) whose analysis present serious difficulties using non-covalent MISPE procedures, as reported previously [8,9]. In parallel, binding sites present in the obtained imprinted polymer were characterised through rebinding experiments.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents

Methacrylic acid (MAA), methyl methacrylate (MMA), ethylene glycol dimethacrylate (EDMA), 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN), methacryloyl chloride and triethylamine were purchased from Sigma–Aldrich (Madrid, Spain). Atrazine (A), simazine (SIM), propazine (PPZ), prometryn (PMT), desisopropylatrazine (DIA) and desethylatrazine (DEA) were pur-

chased from Riedel-de Haen (Seelze, Germany). Stock standard solutions ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) of selected triazines were prepared in toluene and stored at  $-18^\circ\text{C}$ .

Purified water was obtained from a Milli-Q water system purchased from Millipore (Madrid, Spain) and HPLC grade solvents (acetonitrile, toluene, hexane, dichloromethane, ethyl acetate, acetic acid and methanol) were obtained from Scharlab (Barcelona, Spain).

### 2.2. Apparatus

All chromatographic measurements were performed in an HPLC system from Thermo Separation Products consisting of a ConstaMetric 4100 Series high-pressure pump, a Spectro Monitor 5000 photo diode-array detector and a Rheodyne 7725i injection valve equipped with a  $100 \mu\text{L}$  loop. The analytes were separated on a Kromasil ODS column ( $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm I.D.}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ) by gradient elution from 80% of water (A) and 20% of acetonitrile (B) to 20% A and 80% B in 25 min. Triazinic herbicides were monitored at 220 nm and quantified by external calibration using peak area measurements.

Transmission infrared spectra of polymers were obtained using a Spectrum BX FTIR spectrometer (Perkin-Elmer, Boston, USA).  $^1\text{H}$  NMR spectra were recorded on a Varian XL-300 spectrometer at 300 MHz, using deuterated chloroform ( $\text{CDCl}_3$ ) as solvent.

### 2.3. Synthesis of propazine methacrylate

A suspension of propazine (0.544 mmol) in dichloromethane (6 mL) was prepared in a 25 mL flask with magnetic stirring. After closing the system with a septum and purging with a gentle stream of argon, anhydrous triethylamine (0.299 mmol) was injected. The flask was then introduced in an ice bath, and methacryloyl chloride (0.272 mmol) was injected. Reaction took place, according to the scheme shown in Fig. 1A, at room temperature under argon atmosphere. Reaction prosecution was followed by thin layer chromatography using hexane:ethyl acetate (90:10) as eluent and a new product less polar than propazine was detected after 48 h of reaction.

The flask was then introduced in an ice bath and stirred, while methanol and water were added, drop by drop, in order to remove unreacted methacryloyl chloride. The product was then evaporated to dryness and redissolved in dichloromethane (10 mL). Two sequential liquid–liquid extractions were performed with 15 mL of an aqueous NaOH solution (2%) in order to remove methacrylic acid, followed by two liquid–liquid extractions with 15 mL of water to remove basic compounds. Finally, the organic phase was dried with anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , filtered and purified by preparative chromatography in a silica gel column, using an hexane:ethyl acetate (95:5) mixture as eluent. An oily product was obtained (55% yield), which was submitted to characterisation by  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]: 1.20 (d, 6H,  $(\text{CH}_3)_2-(\text{CH}-\text{NH})$ ,  $^3J = 6.6 \text{ Hz}$ ); 1.39 (d, 6H,  $(\text{CH}_3)_2-(\text{CH}-\text{N}-\text{CO})$ ,  $^3J = 6.8 \text{ Hz}$ ); 2.02 (dd, 3H,  $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CH}_2$ ,  $^4J = 1.5 \text{ Hz}$ ,  $^4J = 1.0 \text{ Hz}$ ); 4.0–4.15 (m, 1H,  $\text{CH}-\text{NH}$ ); 4.80–5.0 (m, 1H,  $\text{CH}-(\text{N}-\text{CO})$ ); 5.18 (dd,

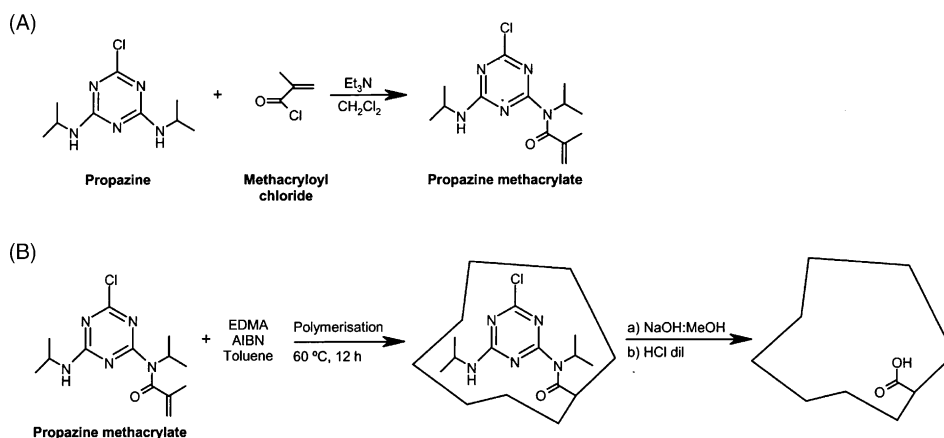


Fig. 1. Reaction scheme of the propazine methacrylate synthesis (A) and the subsequent polymer preparation (B).

1H, CH=CH<sub>2</sub>, <sup>2</sup>J = 1.5 Hz, <sup>4</sup>J = 1.0 Hz), 5.25 (dd, 1H, CH=CH<sub>2</sub>, <sup>2</sup>J = 1.5 Hz, <sup>4</sup>J = 1.0 Hz); 5.52 (d, 1H, NH).

#### 2.4. Synthesis of imprinted polymer

Polymerisation was carried out by precipitation polymerisation by mixing synthesized propazine monomethacrylate (0.64 mmol), EDMA (3.2 mmol), AIBN (0.3 mmol) and toluene (1.9 mL). The mixture was purged with a gentle stream of nitrogen for 5 min, and allowed to polymerise at 60 °C for 12 h. Once polymerised, the obtained particles (10–50 μm) were air-dried for 48 h.

A small amount of the synthesized polymer was stored to be used as control polymer 1 (CP-1), and the rest submitted to hydrolysis. Propazine methacrylate cleavage was done by basic hydrolysis with a (2 M NaOH):MeOH (70:30, v/v) mixture (50 mL) for 6 h under reflux conditions. Finally, the polymer was washed with diluted HCl and methanol. Polymer particles were air-dried and stored at room temperature.

#### 2.5. Synthesis of control polymers

Four polymers were prepared and evaluated as possible control polymers, in order to determine which one best-suited non-specific interactions occurring in the imprinted polymer. As indicated above, CP-1 was just the imprinted polymer with the template still anchored to the polymeric matrix and thus free cavities are not present in this material.

Control polymer 2 (CP-2) was prepared by mixing EDMA (3.2 mmol), AIBN (0.3 mmol) and toluene (1.9 mL) and polymerisation was carried following the above-described procedure. The obtained EDMA polymer was air-dried for 48 h and submitted to basic hydrolysis, thus CP-2 consists of a hydrolysed EDMA polymer.

Control polymer 3 (CP-3) was synthesized by mixing methyl methacrylate (0.64 mmol), EDMA (3.2 mmol), AIBN (0.3 mmol) and toluene (1.9 mL) following the same polymerisation procedure described above. Once polymerised, the particles were air-dried for 48 h. A small amount of the obtained copolymer was stored and used as CP-3, while the rest was submitted to

the above basic hydrolysis procedure leading to control polymer 4 (CP-4).

#### 2.6. Rebinding experiments

About 200 mg of polymer particles were placed in an empty solid-phase extraction cartridge. After conditioning with 50 mL of methanol, 50 mL of acetonitrile and 25 mL of toluene, 1.0 mL of standard solution of propazine in toluene at a concentration range from 0.05 to 100 mg L<sup>-1</sup> was loaded onto the cartridge. Non-specifically bound propazine was removed by washing with 1 mL of a toluene:acetonitrile (95:5, v/v) mixture, and the analyte was quantitatively eluted with 1 mL of acetonitrile and 2 × 1 mL of a methanol:acetic acid (95:5, v/v) mixture. Then, the extract was evaporated to dryness and redissolved in 1.0 mL of Milli-Q water. Analyte concentrations in this final solution, representing the amount of bound analytes (B), were determined by HPLC-UV as described above. The amount of unbound analyte (F) was obtained from subtracting B from the initial analyte loaded onto the polymer.

#### 2.7. Sample preparation

A volume of 40 mL of acetonitrile was added to 10 g of sample (soil, potato and corn) and the mixture was sonicated for 30 min. The supernatant was filtered through a 0.45 μm filter, and the extracts were evaporated to dryness in a Univapo Concentrator system from Biogen Científica S.A. (Madrid, Spain) and redissolved in 1.0 mL of toluene containing 200 μg L<sup>-1</sup> of each triazine for MISPE.

#### 2.8. MISPE of sample extracts

About 200 mg of the molecularly imprinted polymer were placed in an empty solid-phase extraction cartridge from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands) and conditioned with 50 mL of methanol, 50 mL of acetonitrile and 25 mL of toluene. The conditioning step used between samples consisted of 2 × 6 mL of acetonitrile and 2 × 6 mL of toluene. Next, the sample extracts were loaded onto the polymer, and washed with 1 mL of a toluene

solution containing 5% of acetonitrile. Subsequently, the analytes were eluted with 1 mL of acetonitrile and  $2 \times 1$  mL of a methanol:acetic acid (95:5, v/v) mixture. Finally, the extracts were evaporated to dryness and redissolved in 1.0 mL of Milli-Q water for HPLC analysis.

### 3. Results and discussion

As stated in Section 1, previous works of our group [8,9] demonstrated the suitability of non-covalent propazine-imprinted polymers for the selective recognition of triazines. However, in certain applications, it was necessary to include a previous clean-up step in order to reduce the observed non-specific interactions between some sample interfering components and the polymeric matrix. Thus, theoretically, an imprinted polymer synthesised by the semi-covalent approach would allow the reduction of such non-specific interactions improving the performance of the MISPE procedure.

The first step for the preparation of the new MIP was the synthesis of a suitable template with polymerisable groups in its structure. Fig. 1A shows the reaction scheme for the synthesis of propazine methacrylate which, once incorporated to the polymeric matrix, can be hydrolysed in basic conditions (Fig. 1B). In such way, propazine can be removed and cavities complementary in size and shape having  $\text{—COO}^-$  moieties obtained. Subsequently,  $\text{—COO}^-$  groups can easily turn in  $\text{—COOH}$  after acid hydrolysis of the polymer, functional group able to interact with propazine during rebinding process. It is important to stress that polymer matrix might be affected under basic conditions [15]. Thus, it is necessary to treat the polymer under those conditions able to cleavage covalent bond of template, removing propazine, while polymeric matrix remains unaltered as much as possi-

ble minimising the creation of non-selective sites. In this sense, and based on previous works on semi-covalent imprinted polymers [16–18], polymers were treated with a (2 M NaOH):MeOH (70:30, v/v) mixture for 6 h under reflux conditions.

#### 3.1. Selection of control polymer

In order to clearly demonstrate the success of the imprinting process, it is necessary to compare the performance of the imprinted polymer with that of the corresponding control polymer. When the non-covalent approach is used, control polymer is prepared in the same way than the corresponding imprinted polymer but without the addition of template. However, this approximation would not be valid for polymers prepared by the semi-covalent approach since acidic moieties are only located inside the formed cavities and not randomly distributed within the polymeric matrix. Accordingly, four different non-imprinted polymers were prepared and evaluated as possible control polymers. These control polymers were selected according to the possible non-specific interactions that could take place in the semi-covalent MIP. Thus, the influence of possible  $\pi\text{—}\pi^*$  hydrophobic interactions between remaining non-hydrolysed propazine methacrylate and triazines, polymeric structure, and polymer changes during hydrolysis procedure should be evaluated. Fig. 2 shows schematically the structure of the obtained polymers. CP-1 represents a non-hydrolysed MIP, with the cavities still occupied by the template molecule, therefore unavailable for specific interactions during rebinding process. CP-2 stands for a hydrolysed EDMA polymer representing the polymeric matrix after the different chemical treatments. Finally, CP-3 and CP-4 are EDMA–MMA copolymers, with and without performing basic hydrolysis, respectively, which are representative of the

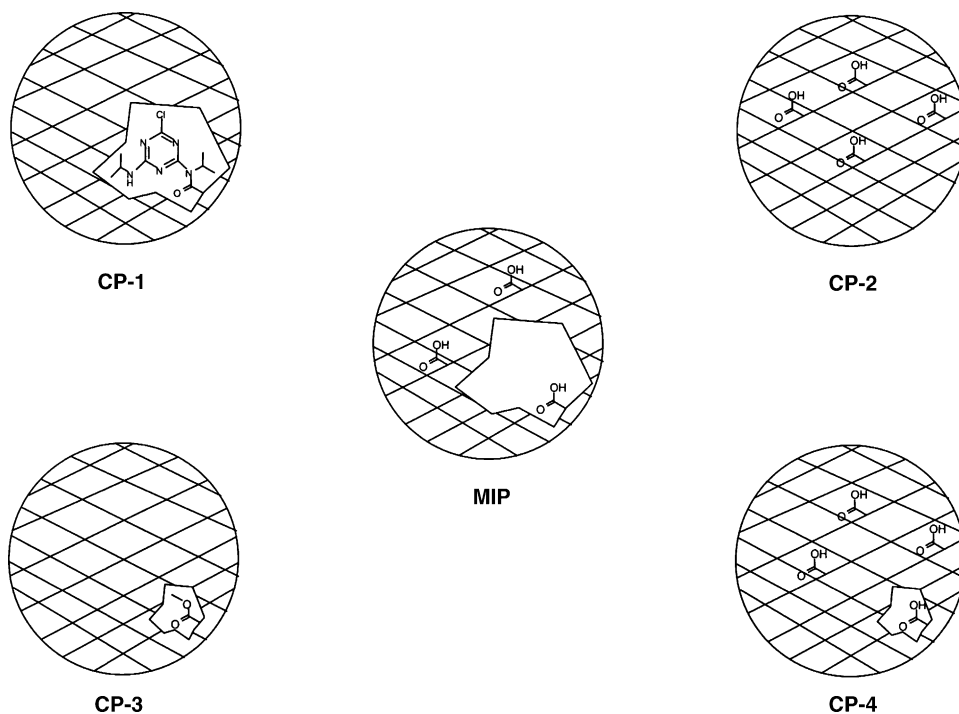


Fig. 2. Schematic structure of imprinted and control polymers studied.

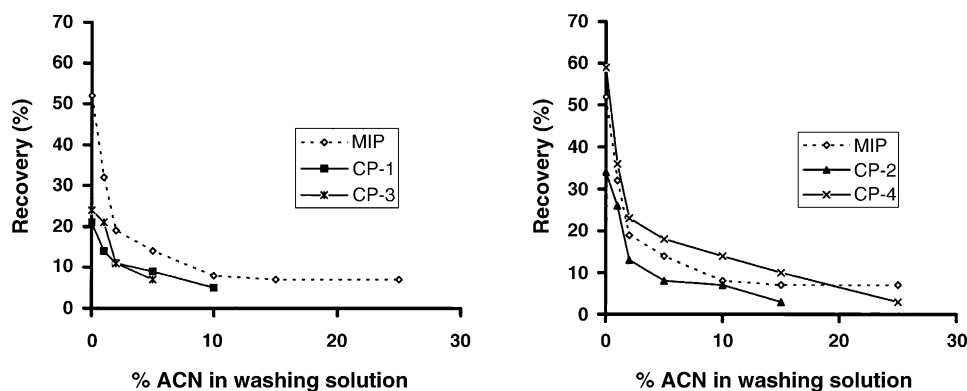


Fig. 3. Recoveries obtained for isoproturon regarding to the amount of ACN present in the washing solution after loading of 1 mL toluene solution of isoproturon ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ) onto the different polymers evaluated.

influence of the presence of methacrylate and methacrylic acid functional groups within the polymeric structure.

IR spectra of obtained polymers (not shown) were measured in order to get a first approximation of the functional groups present within the polymeric matrices. By comparing the spectra pairs CP-1/MIP and CP-3/CP-4 it was observed a decrease in the intensity of the C=O band in each pair ( $1734$  and  $1727 \text{ cm}^{-1}$ , respectively) indicating that amide and ester cleavage took place after hydrolysis. Besides this, it was observed the presence of a band at  $3400 \text{ cm}^{-1}$  in the spectra of hydrolysed polymers (CP-2, CP-4 and MIP) due to O–H stretching vibrations of isolated hydroxyl groups. Thus, these results would suggest that the more appropriate control polymers to evaluate non-specific interactions would be CP-2 and CP-4.

In order to confirm the above-mentioned hypothesis on the best-suited control polymer, the fate of isoproturon in a MISPE process using both the MIP and the four CPs was studied. Isoproturon is an herbicide of phenylurea family with similar size and polarity but with a completely different chemical structure to that of propazine and thus able of interacting with MIP only through non-specific binding. Consequently, the same behaviour in both the MIP and the appropriate CP should be observed for this compound. Thus, isoproturon was loaded in toluene onto MIP and the four control polymers following a typical MISPE procedure including a washing step with mixtures of acetonitrile:toluene and Fig. 3 shows the recoveries obtained in the different experiments. As could be expected, isoproturon was not recognized by the MIP, which presents an analogous behaviour to that of the non-imprinted polymers. However, some differences within them were observed. Firstly, the recoveries obtained for isoproturon when loaded on CP-1 and CP-3 are different compared to those obtained using CP-2 and CP-4, respectively, which can only be attributed to structural changes of the polymeric matrix during hydrolysis. Therefore, non-hydrolysed polymers (CP-1 and CP-3) are not appropriate to mimic non-specific binding occurring in MIP and thus were discarded in further experiments. Regarding CP-2 and CP-4, and according to the results shown in Fig. 3, it can be concluded that CP-4 is the non-imprinted polymer that best mimics the non-specific interactions of isoproturon in the MIP, since obtained recoveries are similar for both polymers. It seems clear that the presence of acidic moi-

eties located both randomly and inside the small cavities makes CP-4 to behave similarly to MIP and thus it was selected as control polymer for further experiments.

### 3.2. Optimisation of MISPE procedure and rebinding experiments

Once the most representative non-imprinted polymer was selected, the optimisation of the different steps involved in a MISPE procedure for the selective extraction of triazines was carried out. Analyte solutions prepared in toluene were used during loading step since this solvent provided quantitative recoveries of triazines in our previous works using non-covalent imprinted polymers [8,9]. Washing solution was optimised by increasing its polarity by the addition of acetonitrile. Thus, different toluene:acetonitrile solutions were tested for the removal of non-specific interactions between both the template and structurally related compounds and the polymers (MIP and CP-4). To perform this study, 1 mL toluene solutions of each target analyte ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ) were loaded independently on both CP-4 and MIP and different toluene:acetonitrile mixtures were evaluated as washing solutions. From this study, it was firstly observed that just 1 mL of toluene was enough for washing-out analytes from CP-4 whereas they remained quantitatively bound to the MIP. This considerable difference in the behaviour of both polymers confirmed the presence of selective cavities within the polymeric matrix of the new semi-covalent MIP. Besides, losses of analytes from MIP were observed only for toluene solutions containing acetonitrile in amounts higher than 5%. Thus, a toluene:acetonitrile mixture (95:5, v/v) was selected as optimum washing solution, since it minimises non-specific interactions without disturbing specific interactions in the imprinted polymer. Finally, elution of analytes was achieved with 1 mL of acetonitrile and  $2 \times 1 \text{ mL}$  of a methanol:acetic acid (95:5, v/v) mixture. Recoveries obtained were higher than 90% for all the analytes tested. Thus, optimum conditions were used for all further rebinding experiments.

As stated in the Section 1, covalent (semi-covalent)-approach yields polymers with a higher capacity and a more homogeneous binding site distribution than non-covalent imprinted polymers. In order to confirm this statement, different rebinding studies



Table 1

Binding parameters obtained for LF fit to the experimental propazine adsorption isotherms in two propazine-imprinted polymers obtained by semi-covalent (sc-MIP) and non-covalent (nc-MIP) approach

Polymer	$N$ ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ )	$m$	$a$ ( $\text{mM}^{-1}$ )	$K_0$ ( $\text{mM}^{-1}$ )
sc-MIP	0.380	0.95	117.4	151.7
nc-MIP [20]	0.249	0.80	344.6	1484

were carried out and the concentration of bound (B) and free (F) propazine were calculated according to the procedures described in the Section 2. Langmuir–Freundlich (LF) isotherm (Eq. (1)) was selected to assess the binding behaviour of propazine to the MIP since this mathematical model has proven to be able of successfully characterising MIPs through the coefficients  $N_t$  (total number of binding sites),  $a$  (related to the median binding affinity constant  $K_0$  ( $K_0 = a^{1/m}$ )), and  $m$  (heterogeneity index) [19].

$$B = \frac{N_t a F^m}{1 + a F^m} \quad (1)$$

Table 1 shows the obtained fitting coefficients, together to those obtained in a previous study using a non-covalent propazine-imprinted polymer [20]. The accuracy of the fitting parameters was assessed by the low relative standard error (4–8%) and the wide concentration range used. As expected, the imprinted polymer synthesised following the semi-covalent approach presented a more homogeneous binding site distribution, due to the better-defined complex in the pre-polymerisation step. On the other hand, it has to be remarked that, although a higher capacity was obtained in the case of the semi-covalent MIP, it is still much lower than the theoretic capacity, calculated from the amount of template used in the polymerisation step. This result might confirm that large amount of binding sites are destructed during template extraction as suggested previously [21,22]. Finally, it is important to point out that the affinity constant for the MIP presented in this paper is lower than the obtained using the non-covalent MIP. This result is in agreement with the general theory of molecular imprinting that describes the formation of high order complexes during the prearrangement step required by the non-covalent approach which leads to high affinity binding sites in the obtained imprinted polymer. However, in the MIP under study in this paper, a complex with a 1:1 stoichiometry was used and thus the binding sites present a lower affinity for the template [23,24].

### 3.3. MISPE of triazines from sample extracts

Apart from the theoretical consideration on binding sites characterisation described above, the main objective of this work was the use of the new semi-covalent imprinted polymer to the selective extraction of triazines from complex samples. Thus, the MISPE procedure developed was applied to the trace enrichment and sample clean-up of complex vegetable (corn and potato) and soil samples in a unique clean-up step. These samples had proven to be difficult to clean with a non-covalent imprinted polymer in

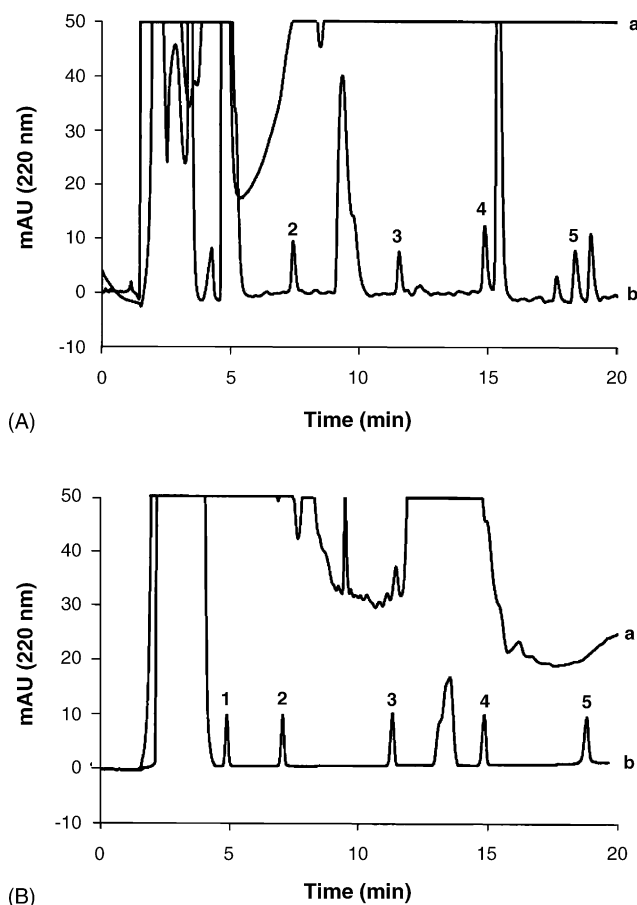


Fig. 4. Chromatograms obtained at 220 nm without (a) and with (b) MISPE of corn (A) and potato (B) sample extracts spiked with triazines ( $20 \text{ ng g}^{-1}$ ). Chromatographic conditions: see Section 2. Peaks: (1) DIA; (2) DEA; (3) simazine; (4) atrazine; (5) propazine.

previous works [8,9], making necessary the inclusion of an additional clean-up step using a non-imprinted polymer to remove polar matrix components that prevented the final accurate determination of target analytes.

Fig. 4 shows the chromatograms obtained with and without MISPE of corn (Fig. 4A) and potato (Fig. 4B) sample extracts spiked at  $20 \text{ ng g}^{-1}$  concentration level and Table 2 summarises the obtained recoveries compared to those obtained using the non-covalent imprinted polymer reported previously [9]. The mean recoveries for samples spiked at  $100 \text{ ng g}^{-1}$  level were in the range from 80 to 95%. As can be observed, the quantification of triazines without clean-up is not possible due to interferences appearing in the chromatograms whereas it can be easily determined after cleaning sample extracts by the proposed semi-covalent MISPE procedure (except DIA in corn). Linear ranges obtained for the different herbicides and crops varied from  $0.4$ – $1.1$  to  $250 \text{ ng g}^{-1}$ . The detection limits, calculated as three times the signal-to-noise ratio, for the analysis of the selected triazines in these samples using the semi-covalent MIP ranged from  $0.4$  to  $1.1 \text{ ng g}^{-1}$  depending upon the herbicide and the crop. Accordingly, it is clear that the proposed semi-covalent MISPE procedure allows the determination of triazines at concentration level below the MRLs recommended by

Table 2

Average recoveries (% ,  $n=3$ )<sup>a</sup> of triazines after direct MISPE of spiked sample extracts (20 ng g<sup>-1</sup> for potato and corn, and 50 ng g<sup>-1</sup> for soil) on semi-covalent (sc-MIP) and non-covalent (nc-MIP) propazine-imprinted polymers

	Potato		Corn		Soil	
	sc-MIP	nc-MIP [9]	sc-MIP	nc-MIP [9]	sc-MIP	nc-MIP
Desisopropylatrazine	83	n.d. <sup>b</sup>	n.d. <sup>b</sup>	n.d. <sup>b</sup>	91	95
Desethylatrazine	86	88	96	n.d. <sup>b</sup>	93	99
Simazine	81	91	85	72	89	92
Atrazine	85	93	92	93	95	105
Propazine	89	116	97	n.d. <sup>b</sup>	90	51

<sup>a</sup> RSDs were below 10% in all cases.

<sup>b</sup> Not detected due to the presence of matrix interfering components.

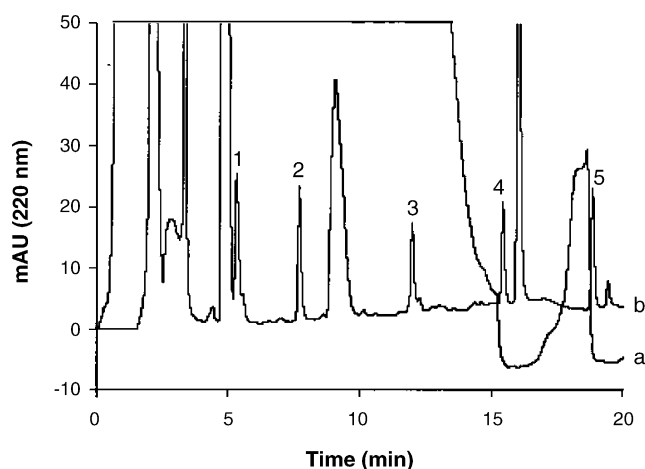


Fig. 5. Chromatograms obtained at 220 nm without (a) and with (b) MISPE of spiked soil sample extracts (50 ng g<sup>-1</sup>). Chromatographic conditions: see Section 2. Peaks: (1) DIA; (2) DEA; (3) simazine; (4) atrazine; (5) propazine.

nowadays legislation which was not possible for some of the triazines studied using the non-covalent MIP.

In parallel, the developed MISPE procedure was evaluated for the analysis of triazines in soil samples. Soil sample extracts were prepared as described in the Section 2 and spiked at 50 ng g<sup>-1</sup> concentration level. Fig. 5 shows the chromatogram obtained in the analysis of the spiked soil extracts with and without performance of the clean-up step using the semi-covalent imprinted polymer. As can be observed, quantification of triazines was easily achieved after MISPE with quantitative recoveries (Table 2) of all target analytes with relative standard deviations lower than 10% ( $n=3$ ). Linearity allowed the determination of up to 250 ng g<sup>-1</sup> of the different triazines in soil samples. The detection limits, calculated as three times the signal-to-noise ratio, for the analysis of triazines in soils using the proposed semi-covalent MISPE method ranged from 0.4 to 2.4 ng g<sup>-1</sup> depending upon the herbicide, low enough to allow the environmental monitoring of triazines at realistic concentration levels.

#### 4. Conclusions

In this paper, it has been clearly demonstrated the potential of a new semi-covalent MIP for the clean-up of triazines in com-

plex sample extracts improving the final determination of these compounds regarding the results achieved until now using non-covalent MIPs. The better definition of the template–monomer complex during pre-polymerisation step yields a polymer with fewer non-specific binding sites, therefore facilitating complex samples clean-up. In parallel, rebinding studies proved that the new semi-covalent MIP presented a highly homogeneous binding site distribution and higher capacities than those obtained when the non-covalent approach was used, in agreement with molecular imprinting theories. Besides this, the careful selection of the appropriate control polymer eased the optimisation of MISPE procedure thus improving the final degree of clean-up achieved leading to quantitative recoveries for target analytes in both vegetable and soil samples.

#### Acknowledgements

The authors wish to thank Ministerio de Ciencia y Tecnología (BQU2002-01348 and CAL01-006) and Universidad Complutense de Madrid for financial support. C.C. wishes to thank Comunidad de Madrid for a predoctoral fellowship. E.T. and A.M.-E. wish to thank Ministerio de Ciencia y Tecnología for Ramón y Cajal contracts.

#### References

- [1] A. Martin-Esteban, Fresenius J. Anal. Chem. 370 (2001) 795.
- [2] N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull, Trends Anal. Chem. 20 (2001) 477.
- [3] F. Lanza, B. Sellergren, Chromatographia 53 (2001) 599.
- [4] F. Chapuis, V. Pichon, M.-C. Hennion, LC-GC Eur. 17 (2004) 408.
- [5] R. Arshady, K. Mosbach, Makromol. Chem. 182 (1981) 687.
- [6] M.T. Muldoon, L.H. Stanker, Anal. Chem. 69 (1997) 803.
- [7] L.I. Andersson, Analyst 125 (2000) 1515.
- [8] E. Turiel, A. Martin-Esteban, P. Fernández, C. Pérez-Conde, C. Cámara, Anal. Chem. 73 (2001) 5133.
- [9] C. Cacho, E. Turiel, A. Martin-Esteban, C. Pérez-Conde, C. Cámara, Anal. Bioanal. Chem. 376 (2003) 491.
- [10] G. Theodoridis, P. Manesiotis, J. Chromatogr. A 948 (2002) 163.
- [11] F.G. Tamayo, J.L. Casillas, A. Martin-Esteban, Anal. Bioanal. Chem. 381 (2005) 1234.
- [12] G. Wulff, A.A. Sarchan, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 11 (1972) 341.
- [13] M.J. Whitcombe, M.E. Rodríguez, P. Villar, E. Vulfson, J. Am. Chem. Soc. 117 (1995) 7105.
- [14] European Community, Council Directive 93/58/EEC, Off. J. L211, p. 6.
- [15] B. Sellergren, K.J. Shea, J. Chromatogr. 635 (1993) 31.



- [16] E. Caro, N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 169.
- [17] T. Ikegami, W.-S. Lee, H. Nariai, T. Takeuchi, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 1898.
- [18] T. Ikegami, T. Mukawa, H. Nariai, T. Takeuchi, *Anal. Chim. Acta* 504 (2004) 131.
- [19] R.J. Umpleby II, S.C. Baxter, Y. Chen, R.N. Shah, K.D. Shimizu, *Anal. Chem.* 73 (2001) 4584.
- [20] C. Cacho, E. Turiel, A. Martín-Esteban, C. Pérez-Conde, C. Cámara, *J. Chromatogr. B* 802 (2004) 347.
- [21] G. Wulff, T. Gross, R. Schonfeld, T. Schrader, C. Kristen, in: R.A. Bartsch, M. Maeda (Eds.), *Molecular and Ionic Recognition with Imprinted Polymers*, American Chemical Society, Washington, DC, 1998 (Chapter 2).
- [22] F.G. Tamayo, J.L. Casillas, A. Martín-Esteban, *Anal. Chim. Acta* 482 (2003) 165.
- [23] H. Kim, D.A. Spivak, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 11269.
- [24] A.M. Rampey, R.J. Umpleby, G.T. Rushton, J.C. Iseman, R.N. Shah, K.D. Shimizu, *Anal. Chem.* 76 (2004) 1123.



## Euroanalysis XIII

Salamanca, 2004



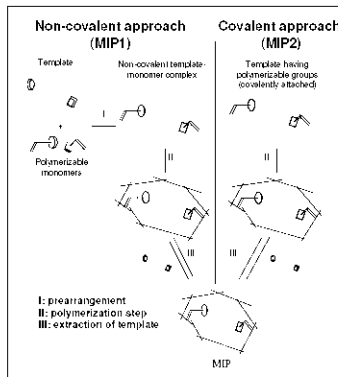
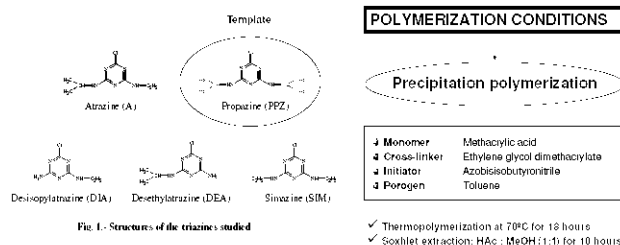
### MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS FOR TRIAZINES ANALYSIS: COVALENT VERSUS NON-COVALENT APPROACH

C. Cacho<sup>1</sup>, E. Fatjó<sup>1</sup>, D. Ayala<sup>2</sup>, E. Turiel<sup>1</sup>, A. Martín-Esteban<sup>3</sup>, C. Pérez-Conde<sup>1</sup> and C. Cámara<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dep. de Química Analítica, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain, <sup>2</sup>Dep. Química y Materiales, Universidad Europea de Madrid, 28670 Madrid, Spain, <sup>3</sup>Dep. de Medio Ambiente, INIA, Crta. A Coruña Km. 7.5, E-28040 Madrid, Spain.

#### INTRODUCTION

Triazine herbicides (Fig. 1) have been widely used in the past century for weed control in several crops such as corn, peas, potatoes or tea. Due their mobility and persistence, triazines accumulation in water, soil and vegetables have occurred, making these herbicides to be considered as important contaminants of our environment. The analysis of these compounds in vegetable samples is not an easy task due to the complexity of the matrix and to the lack of selectivity of the common detectors employed. Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) are tailor-made materials with selective binding sites able to recognize a certain molecule. Their synthesis is based in the formation of defined (covalent or non-covalent) interactions between a template molecule and functional monomers during the polymerisation process in the presence of a cross-linker agent. After polymerisation, the template molecule is removed, leaving cavities complementary in size and shape to the analyte, enabling the polymer to selectively rebind this molecule. In this work, the synthesis, evaluation and comparison of two different propazine-imprinted polymers (using the covalent or the non-covalent approach) prepared by the precipitation polymerization technique is presented. The ability of both polymers to selectively rebind propazine (the template molecule) and other related triazines has been evaluated.

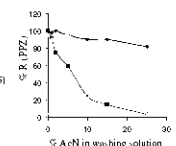


#### IMPRINT EFFECT / NON-SPECIFIC INTERACTIONS

##### Molecular recognition of the template PPZ (behaviour of MIPs vs NIPs)

Loading: 1 ppm of PPZ in 1 ml of toluene  
 Washing: 5 x 1 ml of mixtures acetone/toluene  
 Elution: MIP1 and NIP1: 5 x 1 ml AcH + 8 x 1 ml Methanol  
 MIP2 and NIP2: 5 x 1 ml AcH + 2 x 1 ml Methanol (95/5)

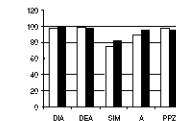
MIP1: Imprinted polymer: non-covalent approach  
 NIP1: non-imprinted polymer: control polymer: non-covalent approach  
 MIP2: Imprinted polymer: covalent approach  
 NIP2: non-imprinted polymer: control polymer: covalent approach



##### Recognition of other chloro-triazines

###### Optimized conditions

Loading: Mixture of 1 ppm of each triazine in 1 ml of toluene  
 Washing: MIP1: 5 x 1 ml toluene containing 5% AcH  
 MIP2: 5 x 1 ml toluene containing 15% AcH  
 Elution: MIP1: 1 x 1 ml AcH + 8 x 1 ml Methanol  
 MIP2: 1 x 1 ml AcH + 2 x 1 ml Methanol (95/5)



- There is a clear imprint effect in both polymers
- Both polymers are able to recognize other chloro-triazines
- Using MIP2 minimizes non-specific interactions

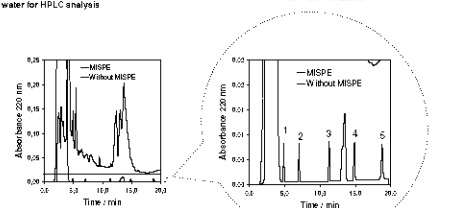
#### MIP2 AS SELECTIVE SPE SORBENT (MISPE)

##### MISPE of triazines from a potato sample extract

Preparation of the potato extracts: 20 ml of acetonitrile were added to 5 g of sample, the mixture was sonicated for 30 min, and the supernatant was filtered through a 0.45 µm filter. Sample extracts were evaporated to dryness and redissolved in 1 ml of toluene, containing 200 µg l<sup>-1</sup> equivalent to 40 ng/g of each triazine for MISPE.

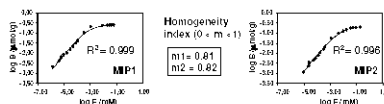
MISPE:  
 Loading: 1 ml of the toluene extract  
 Washing: 5 x 1 ml toluene containing 5% AcH  
 Elution: 5 x 1 ml AcH + 2 x 1 ml Methanol (95/5)  
 Final extracts were evaporated to dryness and redissolved in water for HPLC analysis

1: DIA, 2: DEA, 3: SIM, 4: A, 5: PPZ  
 Quantitative recoveries varying from 80 to 95%, see m obtained

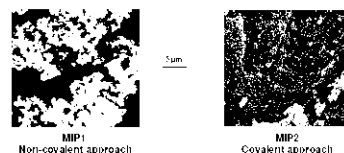


#### MIPs AS HPLC PACKINGS MATERIALS

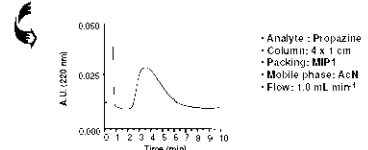
##### Homogeneity of binding sites: Langmuir-Freundlich adsorption isotherms



##### Morphology: Scanning electron micrographs of the obtained polymers



- Both MIPs: highly homogeneous distribution of binding sites
- MIP1: better morphology for HPLC



#### RELATED WORKS

- E. Turiel, C. Pérez-Conde and A. Martín-Esteban, *The Analyst*, 126 (2003) 137.
- C. Cacho, E. Turiel, A. Martín-Esteban, C. Pérez-Conde and C. Cámara, *Anal. Bioanal. Chem.*, 376 (2003) 491.
- C. Cacho, E. Turiel, A. Martín-Esteban, C. Pérez-Conde and C. Cámara, *J Chromatogr. B*, 802 (2004) 347.



# XI Jornadas de Análisis Instrumental

Barcelona, 2005



## COMPARISON OF A NON-COVALENT AND A COVALENT IMPRINTED POLYMER FOR TRIAZINE ANALYSIS IN VEGETABLE SAMPLES

C. Cacho<sup>1</sup>, E. Turiel<sup>2</sup>, A. Martín-Esteban<sup>2</sup>, C. Pérez-Conde<sup>1</sup> and C. Cámara<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dep. de Química Analítica, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain

<sup>2</sup>Dep. de Medio Ambiente, INIA, Ctra. La Coruña Km. 7.5, E-28040 Madrid, Spain

### INTRODUCTION

Triazinic herbicides (Fig. 1) have been widely used in the past century for weed control in several crops such as corn, peas, potatoes or soa. Due their mobility and persistence, triazines accumulation in water, soil and vegetables have occurred, making these herbicides to be considered as important contaminants of our environment.

The analysis of these compounds in vegetable samples is not an easy task due to the complexity of the matrix and to the lack of selectivity of the common detectors employed. In the present work, two MISPE procedures (using covalent and non-covalent imprinted polymers) for the selective extraction and clean-up of several triazines in vegetable samples has been developed allowing the determination of the selected analytes at trace concentration level.

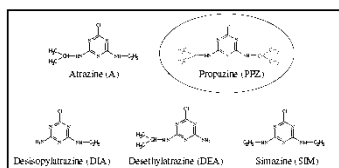
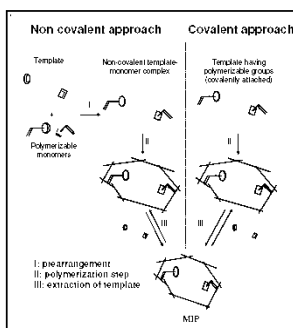


Fig. 1. Structures of the triazines studied



### POLYMERIZATION CONDITIONS

#### Precipitation polymerization

- Monomer: Methacrylic acid
- Cross-linker: Ethylene glycol dimethacrylate
- Initiator: Azobisisobutyronitrile
- Potogen: Toluene

- Thermopolymerization at 70°C for 16 hours
- Soxhlet extraction: H<sub>2</sub>O: MeOH (1:1) for 10 hours

### MISPE OPTIMUM CONDITIONS

	Load	Wash	Elution
Covalent MIP	1 mL toluene	1 mL 5% acetonitrile / toluene	2 mL 3% acetonitrile / toluene
Non-covalent MIP	1 mL toluene	5 mL 15% acetonitrile / toluene	1 mL acetonitrile / 7 mL methanol

### MISPE OF TRIAZINES FROM VEGETABLE SAMPLE EXTRACTS

#### Preparation of the vegetable extracts:

40 mL of acetonitrile were added to 10 g of sample. The mixture was sonicated for 30 min, and the supernatant was filtered through a 0.45 µm filter. Sample extracts were evaporated to dryness and redissolved in 1 mL of toluene, containing 200 µg L<sup>-1</sup> equivalent to 20 ng/g of each triazine.

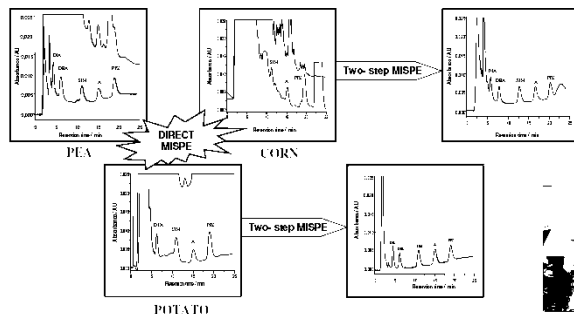
#### Direct MISPE clean-up of vegetable extracts:

The covalent and non-covalent molecularly imprinted polymers (200 mg) were placed in empty solid-phase extraction cartridges and conditioned with 50 mL of methanol, 50 mL of acetonitrile and 25 mL of toluene. Next, the sample extracts were loaded onto the imprinted polymers and washed and eluted with the optimized conditions. The extracts obtained were evaporated to dryness and redissolved in 1 mL of pure water for HPLC analysis.

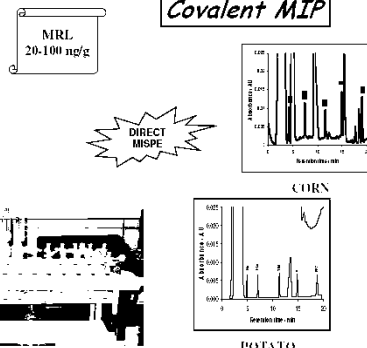
#### Two-step MISPE clean-up of vegetable extracts:

Non-imprinted polymer (200 mg) was placed in an empty SPE cartridge and conditioned as for imprinted polymer. Sample extracts were loaded onto the blank cartridge and washed with 5 mL of toluene solution containing 15% acetonitrile. All fractions (breakthrough and washing solution) were collected in the same vial and diluted with 5 mL of toluene. The final solution was loaded onto the non-covalent MIP cartridge, and the MISPE procedure was performed as described above.

### Non-covalent MIP



### Covalent MIP



### CONCLUSIONS

Two molecularly imprinted polymers, using the covalent and the non-covalent approach have been applied to the clean-up of vegetable samples. Both polymers are able of selectively rebinding several triazinic herbicides.

A good degree of sample clean-up is achieved in the case of pea samples with direct MISPE on non-imprinted polymers, allowing triazine determination below MRL concentration level.

In the case of complex samples, such as corn or potato, either a two-step MISPE procedure (non-imprinted polymer + non-covalent imprinted polymer) or covalent-imprinted polymer can be used.

Sample	DIA	DEA	SIM	A	PPZ
Non-covalent MIP					
Peas	70	75	87	76	78
Corn	n.d.	n.d.	72	93	n.d.
Potatoes	n.d.	88	91	93	116
Covalent MIP					
Corn	97	102	91	96	89
Potatoes	101	93	102	97	98

% Recoveries obtained by the optimum clean-up procedure with a non-covalent MIP and a covalent MIP

### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank DGICYT (BQU2002-01348), Programa Nacional de Alimentación del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Investigación Tecnológica 2000-2003 (CAL01-006), Universidad Complutense de Madrid and Comunidad de Madrid for financial support.





## *4. EMPLEO DE POLÍMEROS IMPRESOS PARA LA DETERMINACIÓN DE BENZIMIDAZOLES EN MUESTRAS DE AGUA*



El principal objetivo del presente trabajo es la puesta a punto de diferentes métodos analíticos para la determinación de benzimidazoles en muestras de agua de río, pozo y grifo a niveles de concentración inferiores a los valores máximos legislados ( $0,1 \mu\text{g/l}$ ). Para ello, se han sintetizado dos polímeros impresos con tiabendazol como plantilla y ácido metacrílico como monómero. Estos polímeros se prepararon empleando etilenglicol dimetacrilato (EDMA) o divinilbenceno (DVB) como entrecruzantes. En ambos casos, la eliminación del analito plantilla empleado en la síntesis de los polímeros se llevó a cabo mediante extracción Soxhlet con una disolución de metanol:acético (50:50, v/v) durante 10 horas. Posteriormente, se han optimizado las condiciones experimentales para lograr el reconocimiento selectivo de los diferentes benzimidazoles presentes en las muestras.

La optimización de las etapas de lavado y elución de los analitos en ambos polímeros se realizó comparando el funcionamiento de cada uno de los polímeros impresos con sus correspondientes polímeros no impresos sintetizados en ausencia del analito plantilla. En este sentido, se demostró que el empleo de 5 fracciones de 1 ml de acetonitrilo en la etapa de lavado elimina cuantitativamente las interacciones inespecíficas en el caso del polímero sintetizado empleando EDMA como entrecruzante, mientras que en el caso del polímero de DVB fue necesario añadir un 2% de dimetilsulfóxido a la disolución de lavado. La disolución óptima de elución de los benzimidazoles fue una mezcla de metanol:ácido acético (50:50, v/v) en ambos casos. En estas condiciones, la recuperación obtenida es superior al 75% para todos los benzimidazoles evaluados.

Con el fin de poder alcanzar elevados factores de preconcentración que permitan la determinación de los benzimidazoles en aguas a los niveles legislados ( $0,1 \mu\text{g/L}$ ), se realizó la evaluación del máximo volumen de muestra que puede ser cargado en el polímero sin pérdida de eficacia, es decir, del volumen de ruptura, siendo muy superior en el caso del polímero impreso que utiliza divinilbenceno como entrecruzante. A la vista de los resultados, este polímero se seleccionó para los estudios posteriores.



Se ha puesto a punto un método analítico que permite la determinación de benzimidazoles en agua mediante un proceso SPE-HPLC-UV en discontinuo. La limpieza y preconcentración de las muestras se realiza en una única etapa. Los extractos procedentes del proceso SPE se evaporan a sequedad mediante una corriente de argón y se redisuelven en 300  $\mu$ L de agua para su posterior análisis mediante HPLC-UV. El procedimiento experimental seguido se resume en la tabla 17.

**TABLA 17: Condiciones experimentales para la determinación en discontinuo  
de benzimidazoles en aguas mediante MISPE-HPLC-UV**

<b><u>Extracción en fase sólida</u></b> (1 gramo de MIP)		
<b>Etapas</b>	<b>Medio</b>	<b>Volumen</b>
Acondicionamiento	Agua MilliQ	50 mL
Carga	Muestra acuosa	$\leq$ 500 mL
Lavado	DMSO:acetonitrilo (2:98, v/v)	5 fracciones de 1 mL
Elución	Metanol:acético (50:50, v/v)	20 fracciones de 1 mL
<b><u>HPLC-UV</u></b>		
<b>Fase estacionaria:</b>	C18 (250 x 4,6 mm; 5 $\mu$ m)	
<b>Fase móvil:</b>		
Tiempo (min)	% disolución A (HAc 4%)	% disolución B (AcN)
0	70	30
7	70	30
12	0	100
18	0	100
<b>Caudal:</b>	1 mL/min	

Este método se ha aplicado con éxito a la cuantificación de diferentes benzimidazoles (albeadazol, benomil, carbendazim, fenbendazol, flubendazol, fuberidazol y tiabendazol) presentes en muestras de agua de río, grifo y pozo. Las muestras se han enriquecido con los analitos en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0,1 y 1  $\mu$ g/L. Los límites de detección del método propuesto variaron entre 0,02-0,03  $\mu$ g/L, dependiendo del compuesto para un volumen de agua de 500 mL. Es importante destacar que cuando la preconcentración se lleva a cabo



empleando adsorbentes no selectivos convencionales [1], la coelución de diversos interferentes no permite la determinación de algunos de los benzimidazoles seleccionados.

Posteriormente, se ha evaluado la posibilidad de utilizar un polímero impreso como fase estacionaria en un proceso cromatográfico, lo que permitiría realizar en una única etapa la preconcentración, limpieza, separación y cuantificación de los analitos. Para ello, se ha rellenado una columna vacía de HPLC (50 x 4,6 mm) con 400 mg del polímero impreso sintetizado empleando DVB. A continuación, se ha optimizado la composición de la fase móvil con el fin de lograr la elución selectiva de los benzimidazoles presentes en la muestra. Las condiciones óptimas aparecen recogidas en la tabla 18. Trabajando en estas condiciones, los diferentes benzimidazoles presentes en la muestra eluyen del polímero impreso al mismo tiempo de retención, si bien se alcanza un alto factor de preconcentración y una excelente limpieza de las muestras, por lo que este método se plantea como un procedimiento de screening para detectar la presencia de benzimidazoles en muestras de agua. En el caso de un resultado positivo, los benzimidazoles podrán cuantificarse empleando el método en discontinuo descrito previamente.

***TABLA 18: Condiciones experimentales para la preconcentración en línea  
de las muestras de agua***

<b>Carga:</b> 50 mL de muestra a 1 mL/min		
<b>Elución:</b>		
Tiempo (min)	% disolución A (metanol)	% disolución B (metanol: ácido acético (80:20, v/v))
3	100	0
Cambio de fase	0	100
10	0	100
<b>Acondicionamiento:</b> 25 mL de agua MilliQ a 2,5 mL/min		





El volumen de ruptura de la columna rellena con el polímero impreso oscila entre los 50 mL para el albendazol y los 150 mL para el carbendazim. Dado que el método se propone como método de screening de la presencia de cualquiera de estos benzimidazoles en muestras de agua, el volumen de muestra cargado sobre el polímero se fijó en 50 mL.

Este artículo se ha enviado para su publicación en la revista Talanta bajo el título *“Molecularly imprinted polymers: An analytical tool for the determination of benzimidazole compounds in water samples”*. Asimismo, se ha presentado en los congresos IX International Symposium of Analytical Methodology in the Environmental Field (Pollensa, 2007) y las 12<sup>as</sup> Jornadas de Análisis Instrumental (Barcelona, 2008).

***Bibliografía:***

[1] D.P. Zamora, J.L.M. Vidal, M.M. Galera, A.G. Frenich, J.L.L. González, M.R. Arahal, *Talanta*, **2003**, 60, 335



## **MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS: AN ANALYTICAL TOOL FOR THE DETERMINATION OF BENZIMIDAZOLE COMPOUNDS IN WATER SAMPLES**

**Carmen Cacho<sup>1</sup>, Esther Turiel<sup>2</sup>, Concepción Pérez-Conde<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain

<sup>2</sup> Departamento de Medio Ambiente. INIA. Carretera de A Coruña Km. 7.5. 28040 Madrid, Spain

\* cpconde@quim.ucm.es, Fax +34913944329



## **ABSTRACT**

Molecularly imprinted polymers (MIPs) for benzimidazole compounds have been synthesized by precipitation polymerisation using thiabendazole (TBZ) as template, methacrylic acid as functional monomer, ethyleneglycol dimethacrylate (EDMA) and divinylbenzene (DVB) as cross-linkers and a mixture of acetonitrile and toluene as porogen. The experiments carried out by molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) in cartridges demonstrated the imprint effect in both imprinted polymers. MIP-DVB enabled a much higher breakthrough volume than MIP-EDMA, and thus was selected for further experiments. The ability of this MIP for the selective recognition of other benzimidazole compounds (albendazole, benomyl, carbendazim, fenbendazole, flubendazole and fuberidazole) was evaluated. The obtained results revealed the high selectivity of the imprinted polymer towards all the selected benzimidazole compounds.

An off-line analytical methodology based on a MISPE procedure has been developed for the determination of benzimidazole compounds in tap, river and well water samples at concentration levels below the legislated maximum concentration levels (MCLs) with quantitative recoveries. Additionally, an on-line preconcentration procedure based on the use of a molecularly imprinted polymer as selective stationary phase in HPLC is proposed as a fast screening method for the evaluation of the presence of benzimidazole compounds in water samples.

## **KEYWORDS:**

Molecularly imprinted polymers, benzimidazole compounds, water samples, multiresidual determination, solid phase extraction



## 1. INTRODUCTION

Benzimidazole compounds (Fig. 1) have been widely used both as anthelmintic drugs in the treatment of parasitic infections and as fungicide agents to prevent spoilage of crops during their transport and storage. Their massive use in the last years has led into their accumulation in the environment, thus contaminating the water streams. European Water Framework Directive [1] has established a maximum concentration level (MCL) of  $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  for most benzimidazole compounds present in natural waters, and a total concentration of all pesticides of  $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ .

The development of highly sensitive methods for the multi-residue determination of benzimidazole compounds in water samples is thus highly desirable, and for that purpose a preconcentration step of the water samples is usually required. In recent years, solid phase extraction has widely been applied for the analysis of different pesticides in water samples, owing to the high enrichment factors achievable by this methodology. Thus, different sorbents ( $\text{C}_{18}$  [2-4], PS-DVB [5] or micelles adsorbed in alumina [6,7]) have been used for benzimidazole preconcentration in water samples. However, the selection of an adequate sample treatment protocol allowing to carry out a multi-residue determination of benzimidazole compounds is currently a challenge, due to their quite different chemical properties. In these sense, extensive sample clean-up or preconcentration procedures can rarely be applied to the determination of a wide variety of benzimidazole compounds, and the use of highly selective detection methods (i.e. tandem mass spectrometry) is usually required for multi-residue analysis [8].

As an alternative, molecularly imprinted polymers have proven to be a very valuable technique for selective solid-phase extraction of the template molecule and structurally related compounds. The inherent selectivity of the molecular recognition of these materials allows a high degree of sample clean-up to be achieved [9,10]. Additionally, molecularly imprinted polymers have also been used for sample enrichment for the determination of a wide range of analytes, such as 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid [11], 4-nitrophenol [12,13], bentazon [14], bisphenol A [15], chloroguaiacol [16], diethylstilbestrol [17] or pirimicarb [18]. Application of molecularly imprinted



polymers for the determination of benzimidazole compounds is however rather scarce. In this sense, they have been recently applied for the analysis of benzimidazole compounds in beef liver [19]. In our previous work, we investigated the ability of molecularly imprinted polymers to act as selective stationary phases for the determination of benzimidazole compounds in fruits both by HPLC [20] and capillary electrochromatography [21]. Working in an organic media, the imprinted polymers did not only selectively rebinding the template molecule, but other benzimidazole compounds as well, thus making them interesting materials for multi-residue determination of benzimidazoles.

Taking all these comments in mind, the main aim of the present work was the synthesis of different MIPs able of selectively rebinding benzimidazole compounds in an aqueous solution. The developed MIPs will then be used for the selective enrichment of tap, river and well water samples, thus enabling the multi-residual determination of a wide variety of benzimidazole compounds at concentration levels below the legislated MCLs.



## **2. EXPERIMENTAL**

### **2.1. Reagents**

Analytical grade benzimidazole fungicides (albendazole (ABZ), benomyl (BEN), carbendazim (MBC), fenbendazole (FenBZ), flubendazole (FluBZ), fuberidazole (FubBZ) and thiabendazole (TBZ)) were purchased from Sigma-Aldrich. The corresponding stock standard solutions ( $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) were prepared in acetonitrile and stored at  $-18^{\circ}\text{C}$ . Purum methacrylic acid (MAA, 98%), ethyleneglycol dimethacrylate (EDMA, 98%) and 2,2'-azo-bis-isobutyronitrile (AIBN,  $\geq 98\%$ ) were purchased from Sigma-Aldrich. Technical grade divinylbenzene (DVB, 80%) was purchased from Sigma-Aldrich and purified by filtration through alumina. AIBN was recrystallized in methanol prior to use. All other reagents were used as supplied without a further purification step. HPLC grade solvents (toluene, acetonitrile, methanol, dimethylsulfoxide and acetic acid) were purchased from Scharlab.

### **2.2. Preparation of polymers**

TBZ imprinted polymers were prepared by adapting a procedure previously developed by Turiel et al. [19]. In this sense, TBZ (0.17 mmol), MAA (0.68 mmol), EDMA or DVB (3.40 mmol) and AIBN (0.25 mmol) were dissolved in a mixture of acetonitrile and toluene (12.5 mL, 75/25 v/v). The solutions were deoxygenated with oxygen-free argon for 10 min while cooling on an ice bath. Polymerization was carried out in a thermostated bath at  $60^{\circ}\text{C}$  for 24 hours, and the flasks were slowly rotated (24 rpm) around their long axis. The polymer particles were separated from the reaction mixture by vacuum filtration on a nylon membrane filter and where washed with 200 mL of a methanol/acetic acid solution (50/50 v/v) to remove both the template molecule and residual monomers. Non-imprinted polymers were prepared in the same manner, but without the addition of the template molecule.



### **2.3. Chromatographic separation of benzimidazole fungicides**

All measurements were performed in an HPLC system from Thermo Separation Products consisting of a ConstaMetric 4100 Series high pressure pump, a SpectroMonitor 5000 photo diode-array detector and a Rheodyne 7725i injection valve equipped with a 100  $\mu$ L loop. The analytes were separated on a C<sub>18</sub>-Kromasil column (250 mm x 4.6 mm i.d., 5  $\mu$ m) purchased from Scharlab. In order to separate all the benzimidazole compounds, an initial isocratic elution with a mixture containing 70% of a water/acetic acid solution (96:4, v/v) (mobile phase A) and 30% of acetonitrile (mobile phase B) was firstly applied for 7 minutes, after which, a gradient to 100% mobile phase B was performed for 5 minutes, keeping these conditions constant for another 6 min. Benzimidazole fungicides were monitored at 200 and 240 nm and quantified by external calibration using peak area measurements.

### **2.4. Off-line enrichment of benzimidazole compounds**

#### *a) MISPE*

1000 mg of MIP-DVB were placed in an empty solid-phase extraction cartridge from Scharlab and conditioned with 50 mL of acetonitrile and 50 mL of MilliQ water. A conditioning step consisting in 25 mL of acetonitrile and 25 mL of MilliQ water was applied between samples. Next, 500 mL of spiked river, tap and well water samples were loaded onto the polymer, and washed with 5x1 mL of an acetonitrile solution containing 2% of dimethylsulfoxide. Subsequently, the analytes were eluted with 12 mL of a methanol/acetic acid (50/50, v/v) mixture. The obtained extracts were evaporated to dryness and redissolved in 0.3 mL of acetonitrile for HPLC analysis.

#### *b) SPE (C<sub>18</sub>)*

Two C<sub>18</sub> discs from Sigma-Aldrich were conditioned with 20 mL of methanol, 20 mL of methanol:water (50/50 v/v) and 20 mL of water. 500 mL of benzimidazole-spiked river, tap and well water samples were loaded on the discs. Benzimidazoles were subsequently eluted with 10 mL of methanol. The extracts were evaporated to dryness and redissolved in 0.3 mL of acetonitrile for HPLC analysis.



## **2.5. On-line enrichment of benzimidazole compounds**

Around 400 mg of MIP-DVB were packed into stainless steel HPLC column (50 mm x 4.6 mm i.d.). The column was then connected to an HPLC system from Thermo Separation Products.

50 mL of spiked river, tap and well water samples were loaded on the MIP-column at a flow rate of  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Subsequently, the mobile phase was switched to pure methanol. After 3 min, the mobile phase was switched to a methanol/acetic acid (80/20, v/v) mixture, which was pumped at a constant flow rate of  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  during 12 min. A conditioning step with 25 mL of MilliQ water was applied between run cycles. Benzimidazole fungicides were monitored at 200 and 240 nm and quantified by external calibration using peak area measurements.





### **3. RESULTS AND DISCUSSION**

#### **3.1. Characterisation of the imprinted polymers**

Precipitation polymerisation is a convenient method for the routine preparation of imprinted polymers, as spherical imprinted polymer beads can be obtained in a simple manner. A rational design and control of the polymerisation conditions have proven essential for the preparation of imprinted polymer beads of the desired particle size. In this sense, an adequate match between the solubility parameters of the developing polymer network and the polarity of the porogenic solvent enables the preparation of polymer beads with permanent pore structures and high average particle sizes.

TBZ imprinted polymers were prepared under the optimised conditions described in section 2.2. The obtained imprinted polymer particulates were characterised by scanning electron microscopy. Spherical polymer beads with a narrow size distribution were obtained, being the average particle diameter of 3.5  $\mu\text{m}$ .

#### **3.2. Optimization of the MISPE procedure**

As has been previously stated in the Introduction section, the aim of this work was the development of MIP-based procedures for the multi-residue determination of benzimidazole fungicides in water samples, at concentration levels below the legislated maximum residue limits. In this sense, two different thiabendazole-imprinted polymers, synthesized using either EDMA or DVB as cross-linkers, have been evaluated for the selective recognition of benzimidazole compounds under aqueous media. In order to evaluate the presence of imprinted sites on the obtained MIPs, the performance of both imprinted polymers has been compared with that of their respective non-imprinted polymers.

Accordingly, different rebinding experiments onto SPE cartridges containing 200 mg of the different MIPs were carried out, working always in parallel with the corresponding NIPs. For this purpose, 2 mL of an aqueous solution containing 1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  of



thiabendazole were loaded onto the cartridges, and the effect of the addition of different organic solvents (i.e. acetonitrile, methanol, dichloromethane and toluene) has been evaluated as possible washing solutions for the removal of non-specifically bound benzimidazole compounds on both imprinted polymers.

Figure 2 shows the recoveries obtained after washing both the imprinted and non-imprinted polymers cartridges with 5x1 mL of the different washing solvents tested. As can be seen, a different performance of the imprinted and non-imprinted polymers was obtained when acetonitrile was used as washing solutions for both imprinted polymers. In this sense, non-specifically bound compounds are completely removed from MIP-EDMA when the cartridges are washed with 5 mL of acetonitrile, while the addition of 2% dimethylsulfoxide is required to completely disrupt the non-specifically bonds between benzimidazole compounds and MIP-DVB, due to the much higher solubility of benzimidazole compounds in this solvent mixture. The differences observed for the performance of each imprinted polymer and their corresponding non-imprinted polymers under these conditions clearly demonstrate the imprint effect of both MIP-EDMA and MIP-DVB.

An enrichment step of the water samples is required in order to achieve the low benzimidazole concentration levels legislated. Thus, and considering that a good degree of selectivity was achieved for both imprinted polymers, selection of the best MIP for the determination of benzimidazole compounds in spiked water samples was done in terms of their respective breakthrough volumes. For this purpose, increasing volumes of aqueous TBZ solutions (containing a total amount of 1 µg) were loaded onto 1000 mg of both MIP-EDMA and MIP-DVB. The cartridges were subsequently washed with the optimized conditions for each of the imprinted polymers and eluted with 16x1 mL (MIP-EDMA) or 12x1 mL (MIP-DVB) of a methanol:acetic acid (50/50, v/v) mixture. Extracts were evaporated to dryness and redissolved in 0.3 mL of acetonitrile for HPLC analysis.



As can be observed in Figure 3, a much higher breakthrough volume was achieved in the case of MIP-DVB (higher than 500 mL, compared to the 150 mL of MIP-EDMA), and thus this polymer was selected for further studies.

The recognition properties of MIP-DVB against other benzimidazole compounds (albendazole, benomyl, carbendazim, fenbendazole, flubendazole and fuberidazole) were then evaluated. With this purpose, 500 mL of solutions containing  $2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  of each benzimidazole compound were independently solid phase extracted onto the MIP-DVB cartridge under the conditions previously optimized. As can be observed in the results shown in Table 1, the MIP is able to selectively rebind all the evaluated benzimidazole compounds. These results suggest that recognition between the benzimidazole compounds and the imprinted polymer takes place through the benzimidazole substructure regardless of the imidazole substituents (see Figure 1), thus enabling the multi-residue determination of benzimidazole compounds.

Under these experimental conditions, an enrichment factor as high as 1300 times was achieved for the different benzimidazole compounds, thus enabling their determination in water samples at concentration levels below the legislated MCLs.

### **3.3. Optimization of the MIP-LC procedure**

An imprinted LC column was prepared by following the experimental procedure described in section 2.5. In this sense, around 400 mg of MIP-DVB were packed in empty HPLC columns and washed with a methanol:acetic acid mixture (1:1, v/v) overnight until a stable baseline was achieved. The remaining acetic acid was then removed by pumping 50 mL of MilliQ water through the columns. This washing procedure was enough to completely remove the template molecule. Thus, no leaking effect was observed in the subsequent blank experiments.

According to the MISPE experiments above described, quantitative elution of benzimidazole compounds from the imprinted polymer can be achieved using a methanol:acetic acid mixture (50/50, v/v). In order to avoid pump damage due to the



repetitive use of such high acetic acid contents in the mobile phase, an experiment was performed in order to diminish the acetic acid content. In this sense, different methanol:acetic acid mixtures have been evaluated as mobile phase for the quantitative elution of benzimidazole compounds from the imprinted column. For this purpose, initial experiments were carried out in isocratic mode elution profile with mobile phases containing methanol and increasing contents of acetic acid. As was expected, an increasing acetic acid content favoured desorption of benzimidazole compounds from the polymers, thus diminishing both the retention times and peak tailing and consequently increasing peak efficiencies. However, a dramatic decrease in the imprinting factor was also observed due to the disruption of the specific interactions between the benzimidazole compounds and the imprinted polymer, being the performance of the imprinted and non-imprinted columns similar for mobile phases containing more than 10% of acetic acid.

Taking these into account, and in an attempt to reduce peak tailing without sacrificing the imprinting factor, a first isocratic mode elution profile with methanol (mobile phase A) was maintained for 3 min, after which the mobile phase is switched to a methanol:acetic acid mixture (mobile phase B) which is maintained until the end of the chromatogram. Thus, the first elution step with pure methanol will ensure a high enough imprinting factor, while the introduction of acetic acid in the second mobile phase will theoretically diminish peak tailing, thus increasing peak efficiency, expressed as the theoretical plate numbers,  $N_{\text{sys}}$ . These were calculated for each analyte using classical chromatographic theory assuming skewed peaks [22], according to equation 1:

[1]

where  $W_{0.1}$  is the peak width at a 10% peak height fraction and  $F_{\text{ass}}$  is the asymmetry factor.

$$N_{\text{sys}} = \frac{41.7 (t_R / W_{0.1})^2}{F_{\text{ass}} + 1.25}$$

As can be observed from data shown in Figure 4, peak efficiencies obtained for thiabendazole increase with increasing acetic acid concentrations, until it reaches a plateau for a methanol:acetic acid (80:20, v/v), which was thus selected as optimum in order to maximize peak efficiency.



Figure 5 shows the chromatograms obtained for an aqueous standard solution of  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  thiabendazole on both the imprinted and non-imprinted polymer under the optimized MIP-LC procedure.

Similar performance was obtained for the rest of the benzimidazole compounds, thus suggesting that the imprinted column is not only able of selectively rebinding the template molecule, but structural analogues as well. From the obtained results, it can be concluded that the on-line enrichment on a MIP-LC column is suitable for the screening of benzimidazole compounds in water samples at the concentration levels required by nowadays legislation without any other sample clean-up. However, identification and quantification of each benzimidazole compound in a mixture should be done by using the MIP cartridges for the off-line sample enrichment, combined with HPLC in reversed phase.

Since obviously the breakthrough volume is dependent on the amount of sorbent, and a lower amount of polymer was used to fill the LC column, the breakthrough volume was evaluated in a similar manner than the above described for the off-line enrichment procedure. In this sense, increasing volumes of aqueous solutions containing  $100 \text{ } \mu\text{g}$  of thiabendazole were loaded on the MIP column at a flow rate of  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . The resultant breakthrough volume for thiabendazole on the imprinted column was of 125 mL. The breakthrough volume of the rest of benzimidazoles was evaluated in a similar manner, and varied from 50 mL of albendazole or benomyl to 150 mL of carbendazim. As the developed on-line enrichment procedure is proposed as screening method for the presence of any of the studied benzimidazole compound in water samples, a volume of 50 mL was selected for the preconcentration of the different samples, to ensure the quantitative determination of all the benzimidazole compounds. Under these conditions, an enrichment factor of around 150 times was achieved.

### **3.4. Method application**



Benomyl residues are known to rapidly hydrolyse into several compounds in both protic organic solvents and aqueous media. In this sense, Mallat et al. [23] evaluated the stability of benomyl residues in water samples at different pH values. These authors concluded that benomyl stability was increased with decreasing pH values, being its half life of 3 h for samples stored at pH 7 in the dark at 4 °C.

Taking into account that abiotic hydrolysis degradation processes are hampered by low temperatures, we evaluated the possibility of storing the samples at -18°C in order to minimise degradation of benomyl. As expected, benomyl was found to be much more stable in samples stored at -18 °C. In this sense, a half life of about 12 days was obtained for both standard solutions and spiked water samples.

#### **3.4.1. On-line enrichment of benzimidazole-spiked water samples**

The on-line enrichment procedure based on the use of an imprinted polymer as selective stationary phase has been successfully applied to the screening determination of benzimidazole compounds in tap, river and well water samples by following the experimental procedure 2.5. Figure 6 shows the chromatograms obtained for tap, river and well water samples spiked with  $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  of the different benzimidazole compounds, obtained after their enrichment by the developed on-line method. As can be observed, the high degree of selectivity of the imprinted polymer enables the separation of benzimidazoles from the interfering matrix compounds.

All the benzimidazole compounds could be quantitatively recovered with RSD values ranging from 1.7 to 5.9 % (n=5). The obtained detection limits were below the legislated MCL in all cases. Results of the recoveries and detection limits obtained for each benzimidazole compound in spiked tap, river and well water samples are summarized in Table 2. As mentioned before, the imprinted polymer is able of recognising all the evaluated benzimidazole compounds in a similar manner. Thus, the on-line developed methodology is suitable for screening purposes, while identification



and quantification of each benzimidazole compound must be carried out by the off-line enrichment procedure on MIP cartridges combined with reversed phase-HPLC.

### **3.4.2. Off-line enrichment of benzimidazole water samples**

The developed MISPE procedure has been applied for the off-line enrichment of benzimidazole spiked tap, well and river water samples. In this sense, 500 mL of each of the water samples spiked with concentrations ranging from  $0.05$  to  $3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  of the benzimidazole compounds (albendazole, benomyl, carbendazim, fenbendazole, flubendazole, fuberidazole and thiabendazole) were loaded onto 1000 mg of MIP-DVB. The cartridge was then washed with  $5 \times 1$  mL of a DMSO:acetonitrile (2:98, v/v) solution and the benzimidazole compounds were eluted with  $12 \times 1$  mL of an acetic acid:methanol (1:1 v/v) mixture. The extracts were subsequently evaporated to dryness and redissolved in 0.3 mL of acetonitrile for HPLC analysis. Comparison of the obtained results with those of an external calibration proved the absence of matrix effect in all of the tested samples.

Figure 7 shows the chromatograms obtained for  $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  spiked tap, river and well water samples, obtained after their enrichment by the proposed off-line MISPE method. The high degree of selectivity of the divinylbenzene-imprinted polymer enables the removal of most interfering compounds in just one washing step. All the benzimidazole compounds could be quantitatively recovered by the proposed MISPE off-line enrichment method, with RSD values ranging from 2.1 to 6.7 % ( $n=5$ ). The obtained detection limits were below the legislated MCL in all cases. A summary of the recoveries and detection limits obtained for each benzimidazole compound in tap, river and well water samples is shown in Table 3.

In parallel, the spiked samples were also analysed after their enrichment on  $\text{C}_{18}$  disks, following a procedure adapted from Zamora et al. [3]. Figure 8 shows the chromatograms obtained under these conditions for  $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  spiked tap, river and well water samples. As can be observed from the chromatograms, a much noisier baseline was obtained when samples were preconcentrated onto  $\text{C}_{18}$  disks. Moreover,



several species interfered in the determination of fenbendazole in all the evaluated water samples, and thus this compound could not be analysed by this method in any of the spiked water samples. Even if near quantitative recoveries were obtained for the rest of benzimidazole compounds, a considerable lack of reproducibility was also observed. For instance, the analysis of tap water samples yielded RSD values as high as 20% for most benzimidazole compounds.

The comparison of the obtained results by both enrichment methods (on MIP-DVB or C<sub>18</sub>) clearly demonstrate the advantage of using molecularly imprinted polymers as selective sorbents for the multi-residual determination of several benzimidazole compounds in spiked tap, river or well water samples.





## CONCLUSIONS

Two thiabendazole imprinted polymers, prepared using ethyleneglycol dimethacrylate and divinylbenzene as cross-linkers, have been synthesized and evaluated for the selective retention of benzimidazole compounds in water samples. Even if a clear imprinting effect has been obtained for both MIPs, DVB-imprinted polymer provides a much higher breakthrough volume, and thus has been selected for the enrichment of tap, river and well water samples. This imprinted polymer is able of selectively rebinding not only the template molecule, but also a wide range of benzimidazole compounds (albendazole, benomyl, carbendazim, fenbendazole, flubendazole, and fuberidazole).

An on-line enrichment procedure based on the use of a DVB-MIP column is proposed as a fast and automatic method for the screening of benzimidazole compounds present in tap, river and well water samples. A confirmatory method based on an off-line MISPE enrichment of the water samples followed by their HPLC analysis, has also been developed. This method enables the identification and quantification of a wide range of benzimidazole compounds in a single run, thus considerably diminishing the analysis time.

The detection limits obtained for both the on-line and off-line enrichment methods are well below the legislated MRLs, thus enabling the analysis of benzimidazole compounds in tap, river and well water samples.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank DGCYT (CTQ2005-02281), Comunidad de Madrid (S-0505/AGR/0312) and Universidad Complutense de Madrid for financial support. C. Cacho wishes to thank Comunidad de Madrid for a predoctoral fellowship.



## REFERENCES

- [1] 2006/11/CE Directive
- [2] R. Jeannot, H. Sabik, E. Sauvard, E. Gessin, J. Chromatogr. A, 379 (2000) 51.
- [3] D.P. Zamora, J.L.M. Vidal, M.M. Galera, A.G. Frenich, J.L.L. Gonzalez, M.R. Arahal, Talanta, 60 (2003) 335.
- [4] A.G. Frenich, D.P. Zamora, J.L.M. Vidal, M.M. Galera, Anal. Chim. Acta, 477 (2003) 211.
- [5] E.A. Hogendoorn, K. Westhuis, E. Dijkman, E.A.G. Eusinkweld, P. Chauvaskul, P. Biadul, R.A. Baumann, A.A. Cornelese, M.A. van der Linden, Int. J. Environ. Anal. Chem., 78 (2000) 67.
- [6] R. Halko, C.P. Sanz, Z.S. Ferrera, J.J.S. Rodríguez, Chromatographia, 60 (2004) 151.
- [7] A. Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Anal. Chim. Acta, 569 (2006) 132.
- [8] M. Danaher, H. De Ruyck, S.R.H. Crooks, G. Dowling, M. O'Keefe, J. Chromatogr. B, 845 (2007) 1-37.
- [9] C. Baggiani, L. Anfossi, C. Giovannoli, Curr. Pharm. Analysis, 2 (2006) 219.
- [10] V. Pichon, K. Haupt, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., 29 (2006) 989.
- [11] C. Baggiani, C. Giovannoli, L. Anfossi, C. Tozzi, J. Chromatogr. A, 938 (2001) 35.
- [12] N. Masque, R.M. Marce, F. Borrull, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, Anal. Chem., 72 (2000) 4122.
- [13] E. Caro, N. Masque, R.M. Marce, F. Borrull, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, J. Chromatogr. A, 963 (2002) 169.
- [14] C. Baggiani, F. Trotta, G. Giraudi, C. Giovannoli, A. Vanni, Anal. Commun., 36 (1999) 263.
- [15] M. Kawaguchi, Y. Hayatsu, H. Nakata, Y. Ishii, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa, Anal. Chim. Acta, 539 (2005) 83.
- [16] C.R.T. Tarley, M.G. Segatelli, L.T. Kubota, Talanta, 69 (2006) 259.
- [17] J.C. Bravo, R.M. Garcinuno, P. Fernandez, J.S. Durand, Anal. Bioanal. Chem. 388 (2007) 1039.
- [18] M.L. Mena, P. Martinez-Ruiz, A.J. Reviejo, J.M. Pingarron, Anal. Chim. Acta, 451 (2002) 297.



- [19] A.G.V. de Prada, O.A. Loaiza, B. Serra, D. Morales, P. Martínez-Ruiz, A.J. Reviejo, J.M. Pingarron, *Anal. Bioanal. Chem.*, 388 (2007) 227.
- [20] E. Turiel, J.L. Tadeo, P.A.G. Cormack, A. Martin-Esteban, *Analyst*, 130 (2005) 1601.
- [21] C. Cacho, L. Schweitz, E. Turiel, C. Perez-Conde, *J. Chromatogr. A*, 1179 (2008) 216.
- [22] J.P. Foley, J.G. Dorsey, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 730.
- [23] E. Mallat, D. Barcelo, R. Tauler, *Chromatographia*, 46 (1997) 342.



## FIGURE CAPTIONS

Figure 1.- Chemical structure of the evaluated benzimidazole compounds

Figure 2.- Effect of the washing solvents on the recoveries obtained for EDMA and DVB polymers

Figure 3.- Evaluation of the breakthrough volume obtained for the off-line enrichment of an aqueous solution containing  $1 \mu\text{g}$  of thiabendazole on 1 g. of MIP-EDMA and MIP-DVB.

Figure 4.- Effect of the addition of acetic acid on the peak efficiency achievable by the on-line enrichment of aqueous samples containing  $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  of thiabendazole on 0.4 g. of MIP-DVB.

Figure 5.- Chromatograms obtained for the retention of an aqueous solution of thiabendazole ( $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) on MIP-DVB (black) and NIP-DVB (gray).

Figure 6.- Chromatogram of water samples enriched by the on-line MIP-LC procedure.  
[Benzimidazole] =  $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

A: tap; B: river; C: well

Figure 7.- Chromatogram of water samples enriched by the off-line MISPE.  
[Benzimidazole] =  $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

A: tap; B: river; C: well

1: fenbendazole, 2: carbendazim, 3: thiabendazole, 4: fuberidazole, 5: albendazole, 6: benomyl, 7: flubendazole

Figure 8.- Chromatogram of water samples enriched by off-line SPE on  $\text{C}_{18}$  disks.  
[Benzimidazole] =  $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

A: tap; B: river; C: well

2: carbendazim, 3: thiabendazole, 4: fuberidazole, 5: albendazole, 6: benomyl, 7: flubendazole



Table 1: Recoveries obtained (%) and RSD for different benzimidazoles on MIP-DVB and NIP-DVB under the optimum SPE procedure

<b>Benzimidazole compound</b>	<b>MIP-DVB</b>		<b>NIP-DVB</b>	
	<b>% Rec</b>	<b>RSD</b>	<b>% Rec</b>	<b>RSD</b>
Albendazole	83.6	3.9	7.1	7.3
Benomyl	75.9	2.5	3.8	4.3
Carbendazim	78.2	2.4	5.1	4.5
Fenbendazole	81.3	2.6	1.8	5.2
Flubendazole	79.7	3.3	n.d.	6.2
Fuberidazole	81.3	2.7	2.6	6.1
Thiabendazole	79.3	1.3	2.8	4.7



Table 2: Recoveries, RSD (n = 5) and detection limits\* obtained after the enrichment of benzimidazole compounds present in spiked water samples ( $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) by the proposed MISPE on-line method

Benzimidazole compound	TAP WATER			RIVER WATER			WELL WATER		
	% Rec	RSD	DL ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	% Rec	RSD	DL ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	% Rec	RSD	DL ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )
Albendazole	99	5.5	0.08	102	6.3	0.09	104	6.5	0.09
Benomyl	102	4.9	0.04	103	4.6	0.05	102	6.7	0.05
Carbendazim	100	4.7	0.07	104	5.1	0.04	100	5.9	0.04
Fenbendazole	106	5.1	0.06	103	4.8	0.06	105	5.2	0.04
Flubendazole	104	3.9	0.03	99	3.6	0.04	103	4.8	0.04
Fuberidazole	99	4.2	0.06	95	5.1	0.03	89	4.7	0.03
Thiabendazole	100	2.8	0.07	102	2.1	0.05	96	4.5	0.04

\*: Calculated as three times the signal/noise ratio



Table 3: Recoveries, RSD (n = 5) and detection limits\* obtained after the enrichment of benzimidazole compounds present in spiked water samples ( $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) by the proposed MISPE off-line method

Benzimidazole compound	TAP WATER			RIVER WATER			WELL WATER		
	% Rec	RSD	DL ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	% Rec	RSD	DL ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	% Rec	RSD	DL ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )
Albendazole	83	3.6	0.012	85	5.1	0.010	86	5.9	0.011
Benomyl	78	3.5	0.006	79	4.5	0.006	77	5.1	0.007
Carbendazim	78	4.2	0.008	81	2.4	0.006	78	5.2	0.005
Fenbendazole	86	2.1	0.007	83	5.2	0.005	85	4.8	0.006
Flubendazole	83	2.7	0.003	79	5.7	0.004	82	4.5	0.003
Fuberidazole	80	4.5	0.008	77	5.8	0.004	73	4.1	0.002
Thiabendazole	79	1.9	0.009	81	1.7	0.006	76	4.5	0.005

\*: Calculated as three times the signal/noise ratio

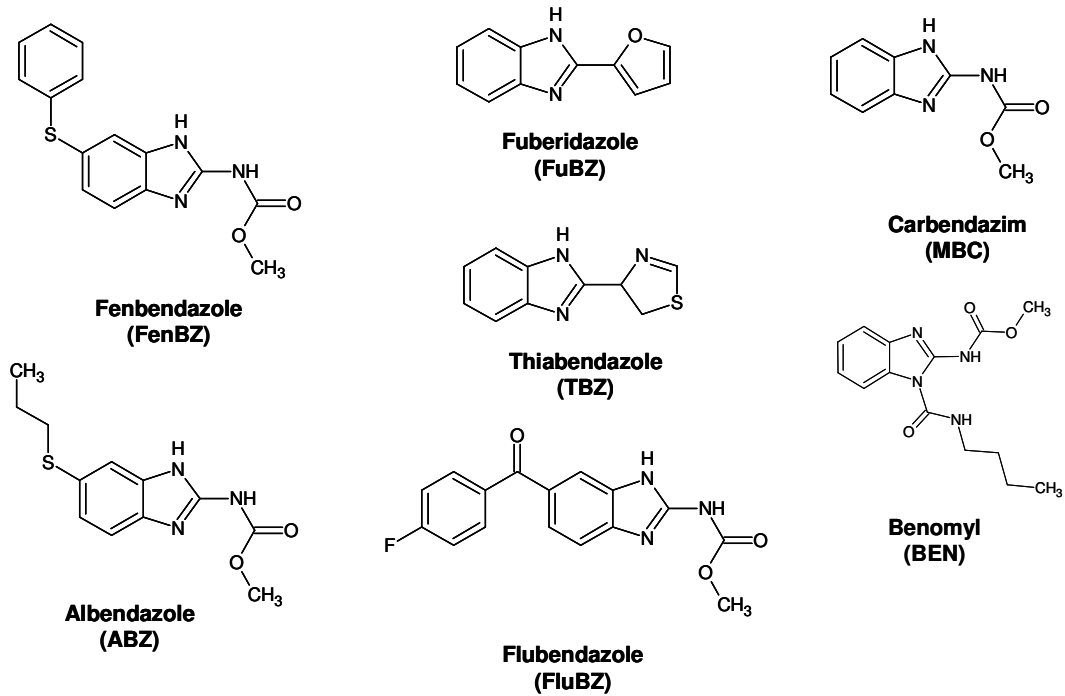


Figure 1



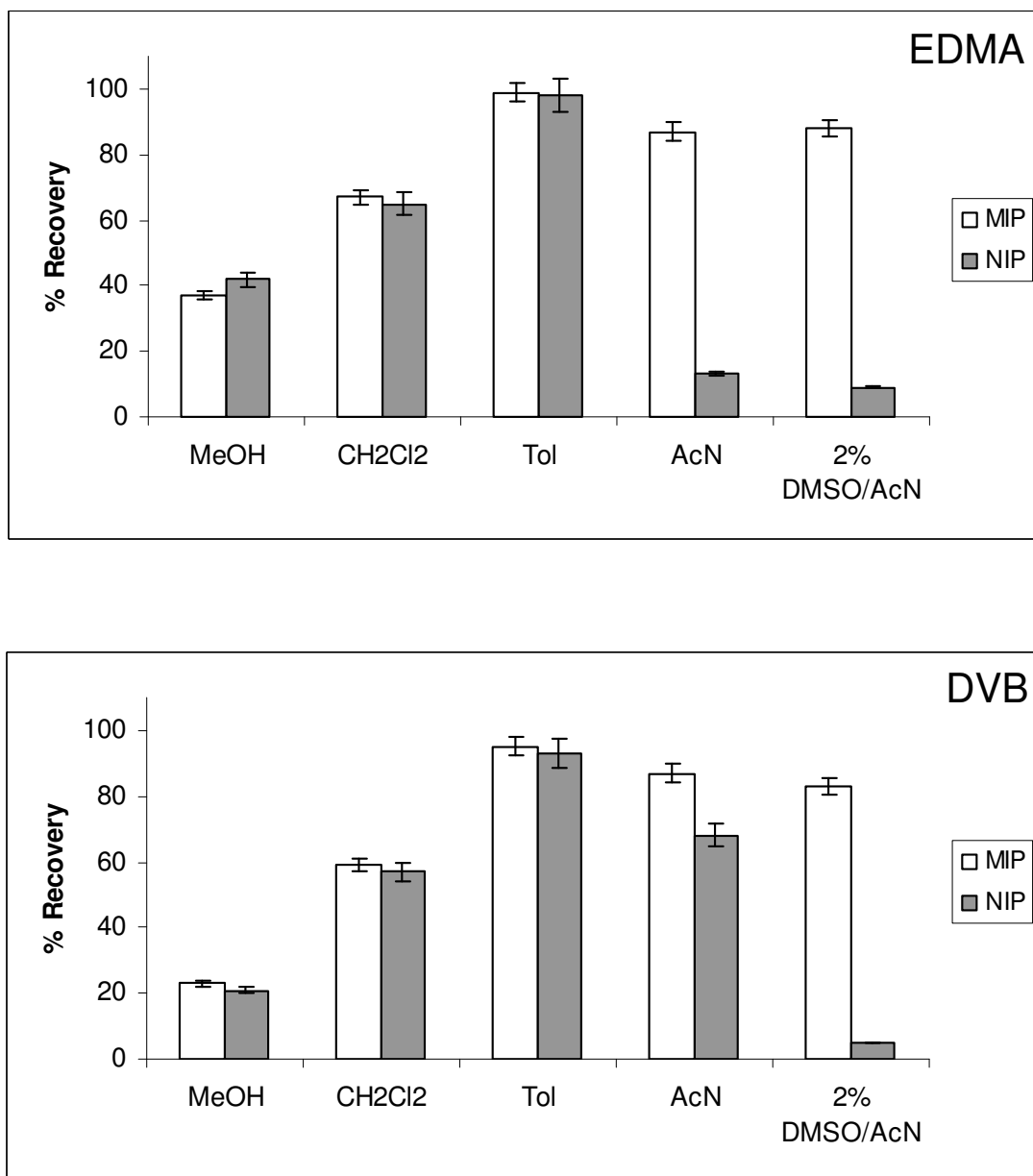


Figure 2

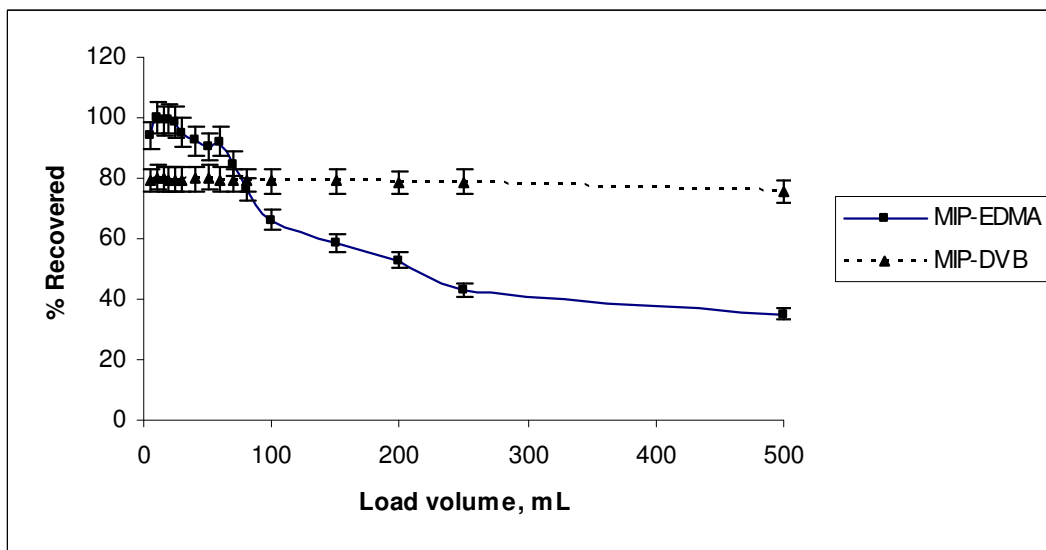


Figure 3

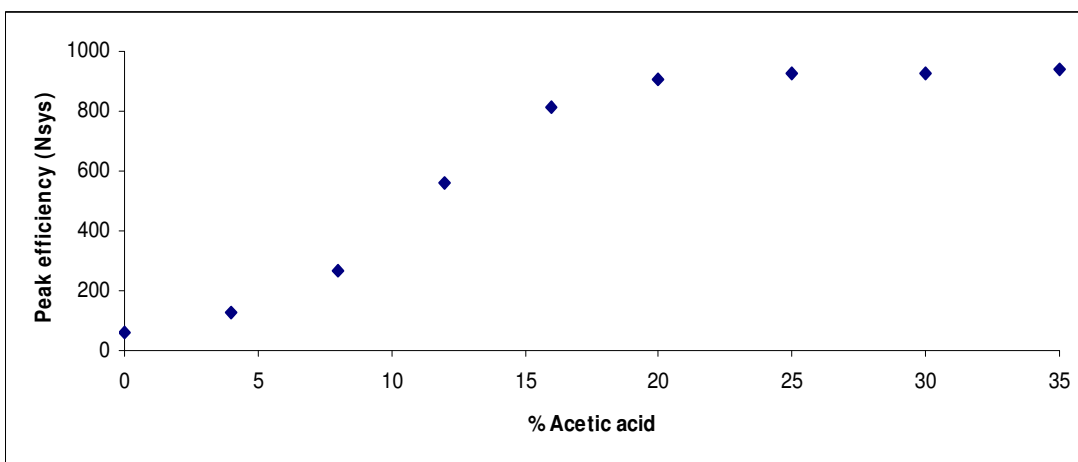


Figure 4

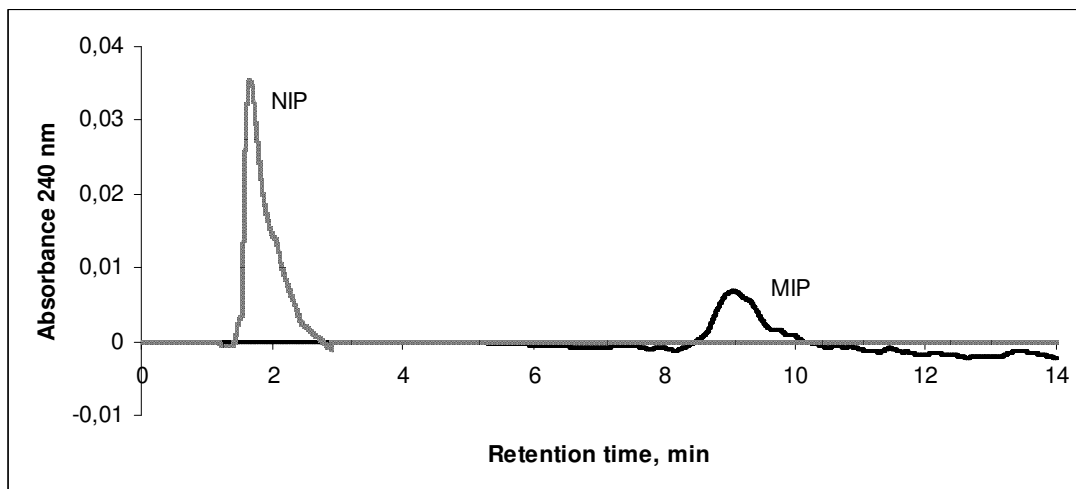


Figure 5

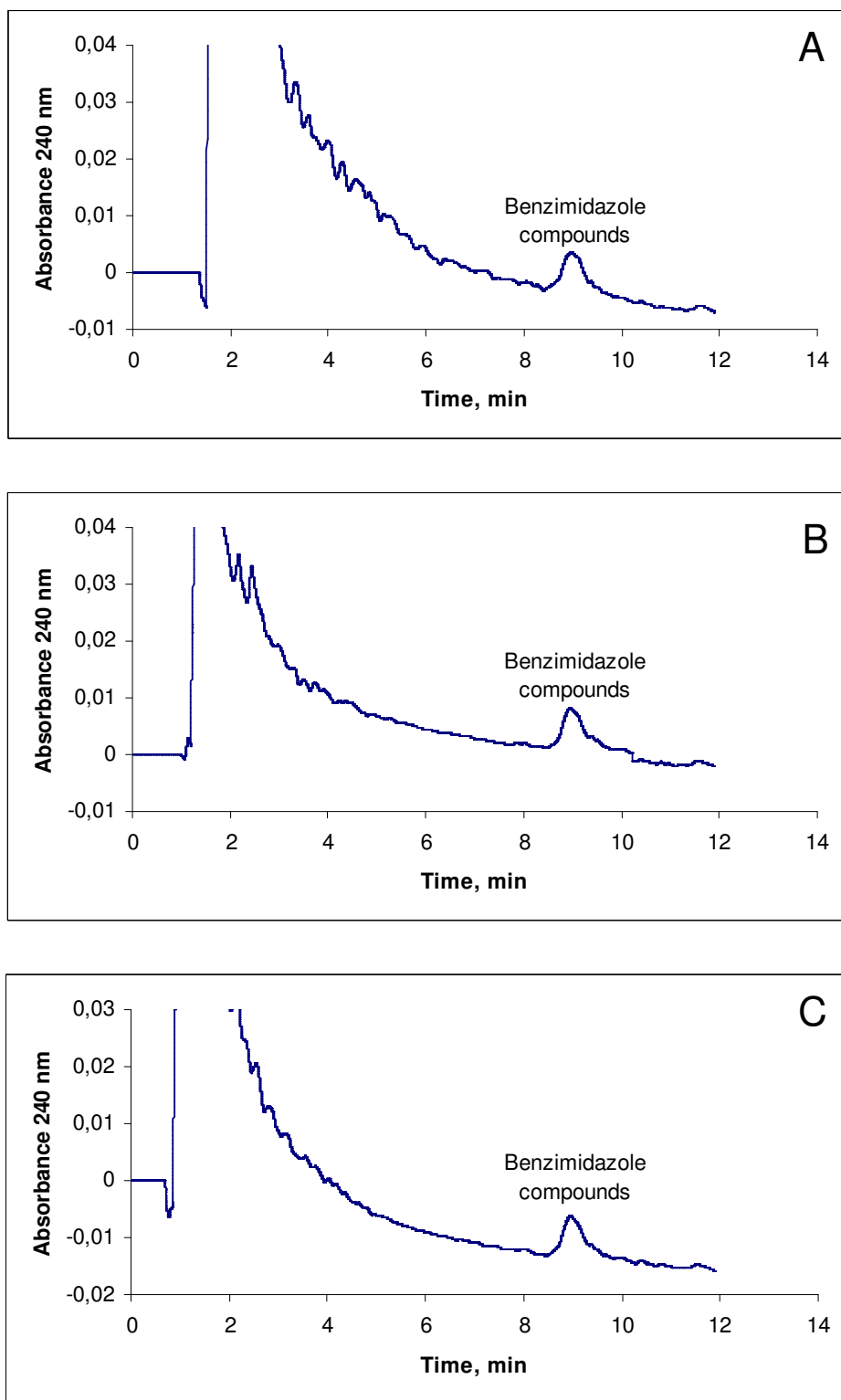


Figure 6

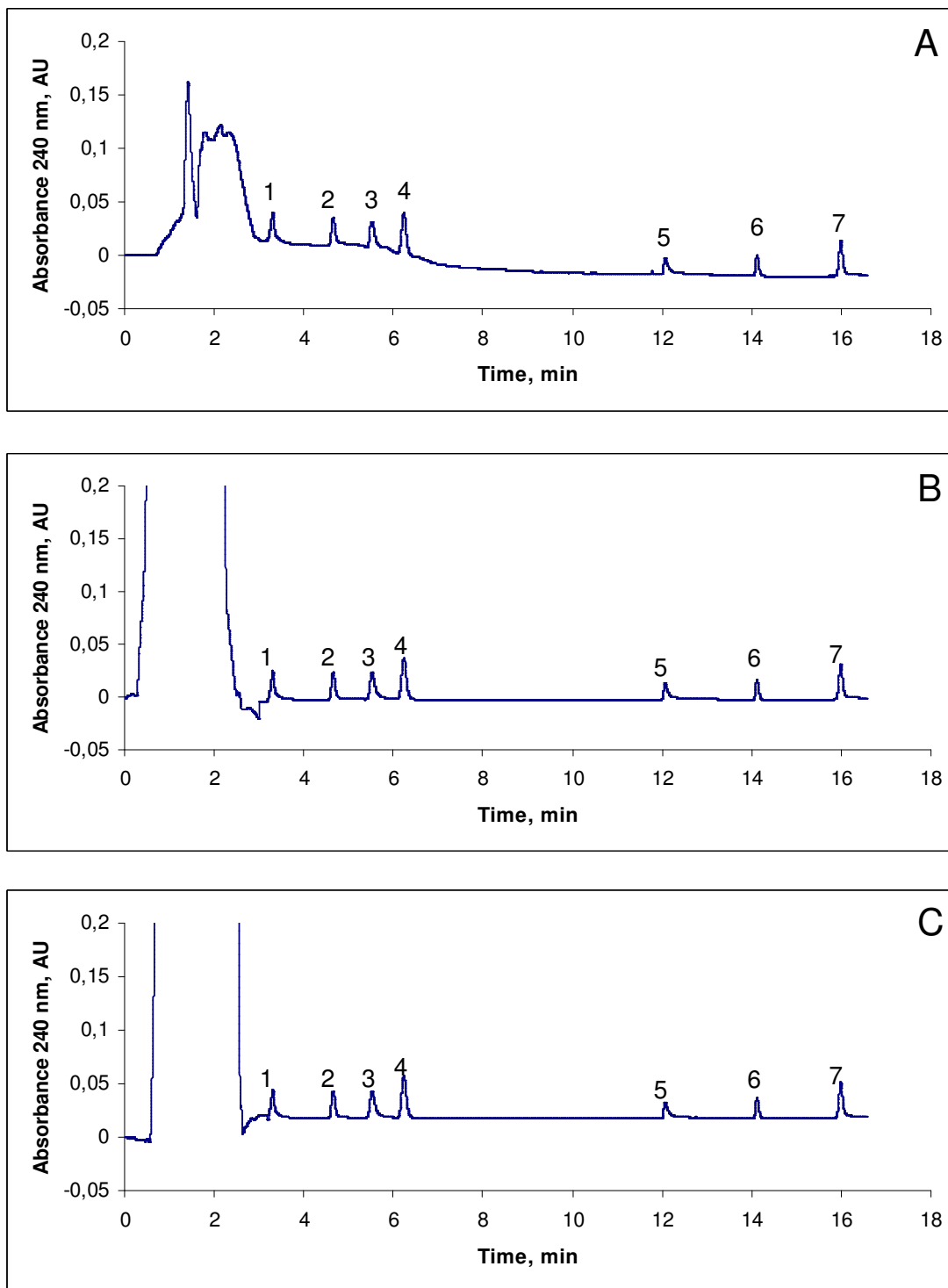


Figure 7

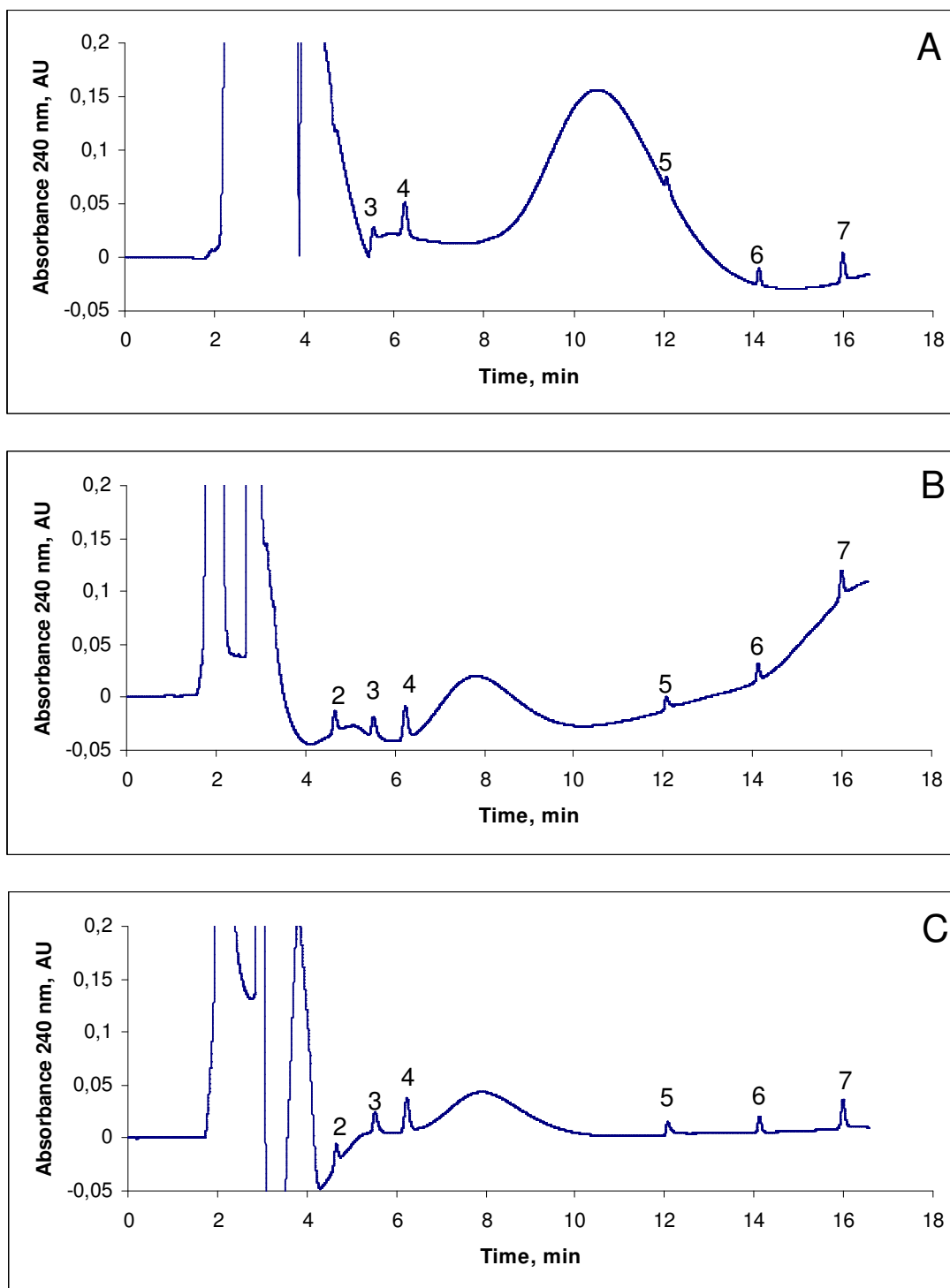


Figure 8



## Empleo de polímeros impresos para la determinación de benzimidazoles en muestras de agua

### IX International Symposium of Analytical Methodology in the Environmental Field Pollensa, 2007



#### MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS AS AN ANALYTICAL TOOL FOR SAMPLE CLEAN-UP: MULTIRESIDUAL DETERMINATION OF BENZIMIDAZOLE COMPOUNDS IN WATER SAMPLES

C. Cacho<sup>1</sup>, E. Turiel<sup>2</sup>, and C. Pérez-Conde<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dep. de Química Analítica, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain  
<sup>2</sup>Dep. de Medio Ambiente, INIA, Ctra. A Coruña Km. 7,5, E-28040 Madrid, Spain.



#### INTRODUCTION

Benzimidazole compounds (Fig. 1) are widely used both as antiparasitic drugs in the treatment of parasitic infections and as fungicidal agents to prevent spoilage of crops during their storage and transport. Their massive use has led to their accumulation in the environment, thus reaching the water streams. Maximum residue limits ranging from 0.1 to 1 µg/L have been legislated, depending on the benzimidazole compound. In recent years, molecularly imprinted polymers have proven to be a very valuable technique for selective extraction of the template molecule and structurally related compounds, thus allowing a high degree of sample clean-up to be achieved. In the present work, a benzimidazole-imprinted polymer is proposed as a selective SPE sorbent for the determination of several benzimidazole compounds in water samples.

#### POLYMERIZATION CONDITIONS

##### Precipitation polymerization

- Monomer: Methacrylic acid
- Cross-linkers: Ethylene glycol dimethacrylate (MIP1), Divinylbenzene (MIP2)
- Initiator: Azobisisobutyronitrile
- Poregen: Toluene:Acetonitrile 3:1
- Thermoprecipitation at 70°C for 24 hours
- Solvent extraction: H<sub>2</sub>O: MeOH 1:1 for 10 hours



Fig. 1 Chemical structures of analyzed benzimidazole compounds

#### MISPE OPTIMUM CONDITIONS

	Mobile phase	Flow rate	Amount of polymer	Amount of polymer
MIP-1	Water	1 mL/min	100 mg	100 mg
MIP-2	Water	2 mL/min	100 mg	100 mg

#### BENZIMIDAZOLE HPLC SEPARATION

Mobile phase	Flow rate	Injection volume	Retention time
Water	1 mL/min	10 µL	10 min
Acetonitrile	1 mL/min	10 µL	10 min

#### MISPE OF BENZIMIDAZOLE COMPOUNDS FROM SPIKED WATER SAMPLES

500 mL of tap, river and well water samples spiked with 0.1-1 µg/L of various benzimidazoles were loaded onto 1 g of MIP-2. The imprinted polymer was subsequently washed with 50 mL of a mixture of DMSO (2%) in acetonitrile. Benzimidazoles were eluted by 50 mL of a methanol:acetic acid 1:1 mixture. Extracts were evaporated to dryness and redissolved in 0.5 mL of acetonitrile for HPLC analysis.

#### BREAKTHROUGH VOLUME

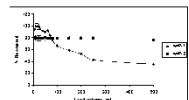


Fig. 2 Breakthrough volume of benzimidazole-imprinted polymers

MIP-2 enables a higher enrichment factor, and is thus selected for the preconcentration of spiked water samples

#### CONCLUSIONS

- Two molecularly imprinted polymers, using ethylene glycol dimethacrylate and divinylbenzene as cross-linkers, have been evaluated for the selective determination of benzimidazoles in environmental water samples
- MIP-2, synthesized using divinylbenzene as cross-linker, enables a much higher enrichment factor than MIP-1, synthesized with ethylene glycol dimethacrylate
- MIP-2 has been successfully applied for the selective enrichment of benzimidazoles in spiked water samples, thus enabling the quantification of all evaluated benzimidazoles at concentration levels below the MRLs.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank DGICYT (CT2005-02261), Comunidad de Madrid (S-0565/AGR-0312) and Universidad Complutense de Madrid for financial support. C. Cacho wishes to thank Comunidad de Madrid for a predoctoral fellowship.



# 12<sup>as</sup> Jornadas de Análisis Instrumental Barcelona, 2008



## MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS FOR THE DETERMINATION OF BENZIMIDAZOLE FUNGICIDES IN WATER SAMPLES

C. Cacho<sup>1</sup>, E. E. Paniagua<sup>1</sup>, O. Zamora<sup>2</sup>, E. Turiel<sup>3</sup>, and C. Pérez-Conde<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dep. de Química Analítica, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, España.

<sup>2</sup>Dep. de Química Analítica, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México.

<sup>3</sup>Dep. de Medio Ambiente, INIA, Crta. A Coruña Km. 7.5, E-28040 Madrid, España.



### INTRODUCTION

Benzimidazole compounds (Fig. 1) are widely used to prevent crop spoilage during their storage and transport. Their massive use has led into their accumulation in the environment, thus reaching the water streams. A maximum concentration level of 0.1 µg/L have been legislated for benzimidazole compounds in water samples.

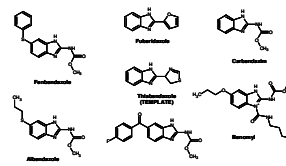
In recent years, molecularly imprinted polymers have proven to be a very valuable technique for the selective extraction of the template molecule and structurally related compounds, thus allowing a high degree of sample clean up to be achieved.

In the present work, the ability of a thiabendazole imprinted polymer for the selective rebinding of benzimidazole compounds in aqueous media is evaluated. Both off-line and on-line SPE procedures are proposed for the selective enrichment of water samples.

### POLYMERIZATION CONDITIONS

#### Precipitation polymerization

- Monomer: Methacrylic acid
  - Cross-linkers: Divinylbenzene
  - Initiator: Azobisisobutyronitrile
  - Porogen: Toluene:Acetonitrile 3:1
- ✓ Thermopolymerization at 70°C for 24 hours  
✓ Soxhlet extraction: HAc : MeOH (1:1) for 10 hours



### OFF-LINE MISPE OF BENZIMIDAZOLE COMPOUNDS FROM SPIKED WATER SAMPLES

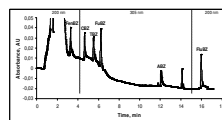
#### EXPERIMENTAL PROCEDURE:

500 mL of tap, river and well water samples spiked with 0.1-1 µg/L of various benzimidazoles were loaded onto 1 g of MIP. The imprinted polymer was subsequently washed with 5x1 mL of a mixture of DMSO (2%) in acetonitrile, in order to remove non-specific interactions. Benzimidazoles were eluted by 8x1 mL of a methanol:acetic acid 1:1 mixture. Extracts were evaporated to dryness and redissolved in 0.3 mL of acetonitrile for HPLC analysis.

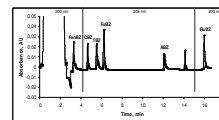
#### HPLC ANALYSIS:

Mobile phase	Isocratic	Gradient	Isocratic
HAc 2%	0-7 min	7-12 min	12-18 min
Acetonitrile	70	70 → 100	100

Stationary phase: Kromasil C18  
250x46 mm, 5 µm i.d.  
Flow rate: 1 mL/min  
Injection volume: 100 µL



Spiked tap water sample (0.1 µg/L)



Spiked well water sample (0.1 µg/L)

#### Recoveries (%) obtained

Benzimidazole	Tap water	Well water	River water
Albendazole	83	86	85
Carbendazim	78	77	78
Fenbendazole	78	78	81
Flubendazole	86	85	84
Flubendazole	83	82	79
Fuberidazole	80	73	77
Thiabendazole	79	76	81

RSD < 4 %  
DL: 0.03 - 0.09 µg/L

### ON-LINE MISPE OF BENZIMIDAZOLE COMPOUNDS FROM SPIKED WATER SAMPLES

#### EXPERIMENTAL PROCEDURE:

Around 300 mg of the imprinted polymer were slurry packed in a LC precolumn (50 x 4.6 mm) placed in the loop of an injection valve.

50 mL of river, tap and well water samples spiked with 0.1-1 µg/L of benzimidazole fungicides were loaded onto the MIP column at a flow rate of 2 mL/min (Pump 2). The imprinted polymer was subsequently washed with 15 mL of methanol at 1.5 mL/min and 5 mL of MilliQ water at 1 mL/min. Benzimidazole fungicides were eluted from the MIP column with 13 mL of water containing 0.5% trifluoroacetic acid (TFA) and 3.5% HAc at a flow rate of 1 mL/min (Pump 1). A gradient to acetonitrile containing the same acid mixture (0.5% TFA/3.5% HAc) was performed in 3 minutes, and this solution was maintained for 9 minutes.

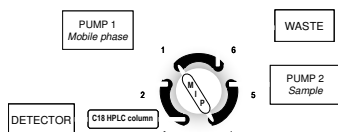
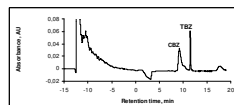
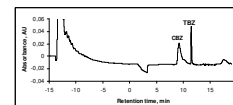


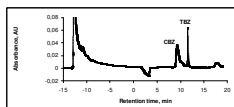
Figure 2. Schematic diagram of the experimental setup for the on-line MISPE of benzimidazole fungicides



Spiked tap water sample (0.1 µg/L)



Spiked well water sample (0.1 µg/L)



Spiked river water sample (0.1 µg/L)

Recovery: 84 - 97 %  
RSD < 5 %  
DL: 1 - 8 ng/L  
Breakthrough volume: 100 mL

### CONCLUSIONS

✗ A molecularly imprinted polymer prepared using thiabendazole as template molecule, methacrylic acid as functional monomer, divinylbenzene as cross-linker and acetonitrile:toluene (3:1, v/v) as porogen, has been synthesized and evaluated for the selective rebinding of benzimidazole fungicides in water samples.

✗ This imprinted polymer has been used as selective sorbent both for the off-line and on-line enrichment of benzimidazole compounds present in water samples. Subsequent separation of benzimidazole compounds is achieved by means of a C<sub>18</sub> column.

✗ The developed methodologies have been successfully applied to the enrichment of benzimidazoles in tap, river and well water samples at concentration levels below the MCLs.

### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank DGCYT (CTQ2005-02281) Comunidad de Madrid (S-0505/AGR/0312) and Universidad Complutense de Madrid for financial support.







## *5. EMPLEO DE POLÍMEROS IMPRESOS COMO FASES ESTACIONARIAS EN ELECTROCROMATOGRAFÍA CAPILAR*





### **5.1. - SEPARACIÓN DEL RACÉMICO DE PROPRANOLOL**

Este trabajo se realizó en AstraZeneca (Mölndal, Suecia) durante el período comprendido entre septiembre y noviembre de 2005, bajo la dirección del Dr. Leif Schweitz. Los resultados de dicho trabajo se presentaron posteriormente en el congreso internacional “*4th International Workshop on Molecularly Imprinted Polymers*” (MIP2006) que tuvo lugar en Cardiff (Reino Unido) en septiembre de 2006.

El principal objetivo de este trabajo fue la obtención de un polímero impreso en formato monolito que permitiera la separación del racémico de propranolol mediante electrocromatografía capilar. Para ello, se prepararon diferentes columnas capilares rellenas con monolitos impresos y no impresos y se comparó su funcionamiento.

La optimización de la síntesis del polímero se llevó a cabo mediante diseños experimentales de tres niveles diferentes. Se han optimizado los siguientes parámetros: concentración del analito plantilla (s-propranolol), iniciador (AIBN), monómero (MAA), entrecruzante (trimetilolpropano trimetacrilato), isooctano y el tiempo de polimerización. Las mezclas diseñadas y el tiempo de polimerización empleados para la síntesis de los monolitos se resumen en la tabla 19. Debido al elevado número de variables y niveles a evaluar, se han empleado dos diseños experimentales en los que se variaron el contenido de isooctano, MAA y TRIM (primer diseño experimental, monolitos 1-12) y el tiempo de polimerización y el contenido de AIBN y s-propranolol (segundo diseño experimental, monolitos 13-23).



**TABLA 19: Condiciones empleadas para la síntesis de cada uno de los monolitos**

<b>Polímero</b>	<b>MAA (<math>\mu</math>M)</b>	<b>TRIM (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Isooctano (%)</b>	<b>AIBN (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Plantilla (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Tiempo (horas)</b>
1, 10-12	650	650	5,5	22	30	2
2	650	730	5	22	30	2
3	650	810	6	22	30	2
4	730	650	5	22	30	2
5	730	730	6	22	30	2
6	730	810	5,5	22	30	2
7	810	650	6	22	30	2
8	810	730	5,5	22	30	2
9	810	810	5	22	30	2
13-15	650	650	6	33	22,5	1,5
16	650	650	6	22	30	1
17	650	650	6	22	30	2
18	650	650	6	44	30	1
19	650	650	6	44	30	2
20	650	650	6	22	15	1
21	650	650	6	22	15	2
22	650	650	6	44	15	1
23	650	650	6	44	15	2

En todos los casos evaluados, la iniciación de la polimerización se llevó a cabo mediante la homólisis fotoquímica del AIBN. Dicho método de iniciación permite controlar fácilmente la disposición espacial del monolito en el interior de la columna capilar, impidiendo de esta forma su polimerización en la zona de la ventana de detección, evitando así la dispersión de radiación en esa zona. Para ello, sólo es necesario cubrir con papel de aluminio las zonas del capilar dónde se quiera evitar la polimerización antes de someterlo a la acción de la radiación UV.

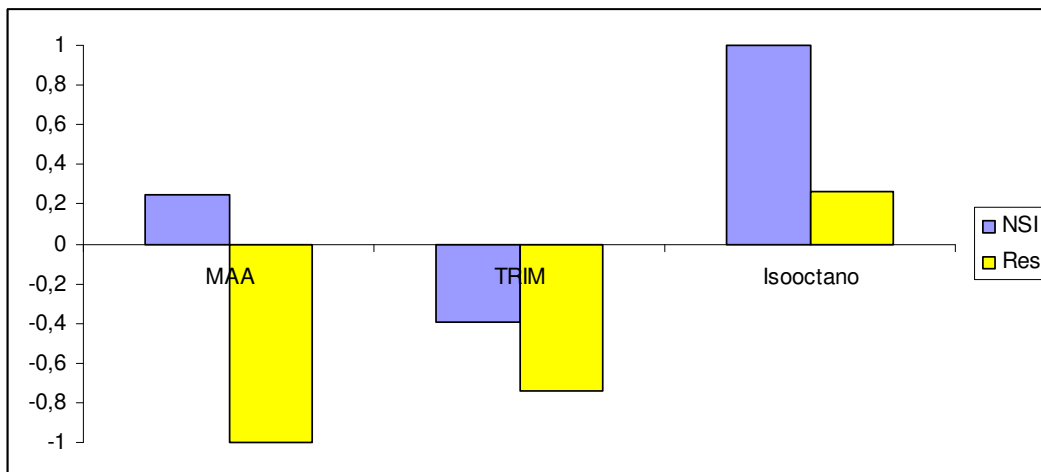


El analito plantilla se eliminó bombeando 50 mL de una disolución de MeOH:HAc (90:10, v/v) a un caudal de 50  $\mu$ L/min a través de los capilares. Posteriormente, se comparó la separación obtenida para el racémico de propranolol mediante electrocromatografía capilar con cada uno de los monolitos. La eficacia de la separación se evaluó mediante el cálculo de la resolución y del índice normalizado de separación, calculado como la relación existente entre la diferencia entre los tiempos de retención de cada uno de los enantiómeros y el tiempo de elución del primero de ellos.

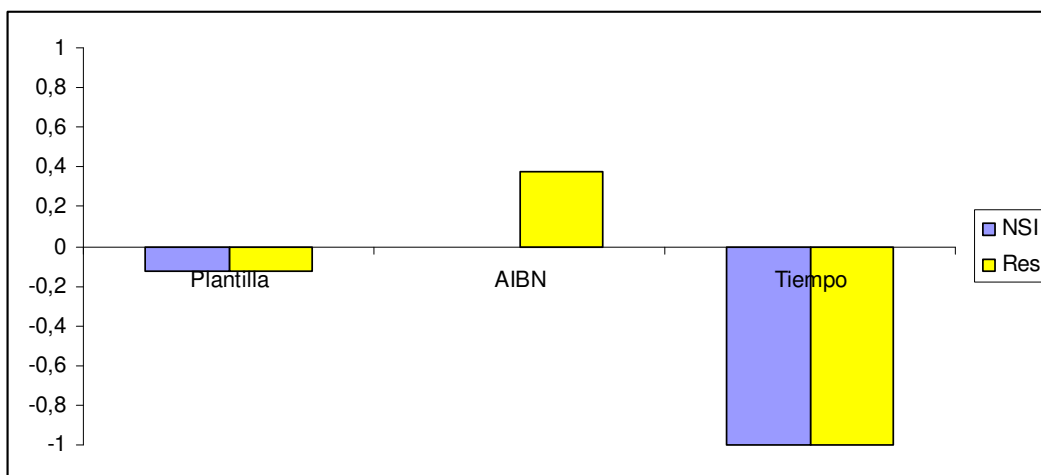
Si bien una mayor separación entre los picos de ambos enantiómeros conduce en principio a una mejor resolución de los mismos, se ha considerado importante evaluar el índice normalizado de separación por ser el que facilita una mayor información acerca de la selectividad de la interacción con el polímero impreso. La resolución se ha definido como  $f/g$ , siendo  $f$  la diferencia entre las absorbancias en el máximo y en la cola del pico y  $g$  la absorbancia en su máximo. Atendiendo a esta definición, dos picos estarán resueltos a línea base siempre que el parámetro  $f/g$  tome un valor de 1, mientras que si éste toma un valor de 0, los picos no estarán resueltos.

Los resultados obtenidos para cada uno de los monolitos se ajustaron mediante el modelo de mínimos cuadrados parciales, obteniéndose un buen grado de correlación entre los parámetros seleccionados para evaluar la separación del racémico de propranolol y el procedimiento empleado para sintetizar los diferentes monolitos. De esta forma, pudo obtenerse un modelo que predijera el grado de separación del racémico para unas condiciones de síntesis dadas.

Los coeficientes obtenidos del ajuste de los resultados mediante mínimos cuadrados parciales permiten predecir el efecto que la variación de cada uno de las variables evaluadas tiene sobre el funcionamiento final del polímero obtenido. En las figuras 22 y 23 se muestra la influencia de cada una de dichas variables sobre el índice normalizado de separación (NSI) y la resolución (Res) de los picos de los enantiómeros del propranolol en cada uno de los diseños experimentales.



**Figura 22:** *Coeficientes normalizados del ajuste de los datos obtenidos del primer diseño experimental (polímeros 1-12)*



**Figura 23:** *Coeficientes normalizados del ajuste de los datos obtenidos del segundo diseño experimental (polímeros 13-23)*

La porosidad de los monolitos sintetizados se controló mediante la adición de isooctano a la mezcla de polimerización, considerándose que una porosidad adecuada es aquella que permite el bombeo de la fase móvil a través del capilar. Los monolitos sintetizados con un contenido de isooctano comprendido entre un 5 y un 6% tenían una porosidad que permitía el paso de la disolución al bombearla tanto con una bomba de HPLC como aplicando una presión de 12 bares en el equipo de electroforesis capilar.



Los resultados obtenidos al comparar el funcionamiento de los polímeros en función de la cantidad de isooctano empleada en la síntesis demuestran que la separación de los enantiómeros es tanto mejor cuanto mayor sea la cantidad de isooctano presente durante la polimerización. Este hecho se ha atribuido a una mayor porosidad de los monolitos obtenidos, que facilita la transferencia de masa del analito plantilla hacia los huecos específicos generados.

En cuanto a la concentración del monómero empleado, se observó que un incremento en la misma conduce a la síntesis de un polímero con un número mayor de sitios de unión tanto específicos como inespecíficos. El aumento de las interacciones inespecíficas se traduce en una considerable disminución de la resolución de los enantiómeros, debido al ensanchamiento de los picos. Por otro lado, el aumento de los puntos de unión específicos se traduce en un mejor reconocimiento del enantiómero empleado como plantilla, por lo que el índice normalizado de separación entre ambos enantiómeros aumenta considerablemente al alcanzarse una mayor separación de los compuestos. Atendiendo a estos efectos contrapuestos, se ha seleccionado una concentración intermedia de monómero como situación de compromiso.

En lo que se refiere a la concentración de entrecruzante (TRIM) empleada, se ha observado como la separación del racémico mejora considerablemente al disminuir la cantidad de entrecruzante empleada durante la polimerización. Este hecho se debe a que, si bien la presencia de entrecruzante contribuye a estabilizar la disposición espacial de las cavidades tras la eliminación de la plantilla, la densidad del polímero resultante aumenta considerablemente, dificultando la accesibilidad de los enantiómeros a los puntos de unión.

Un incremento en la concentración de iniciador conduce a una polimerización más rápida que, a igualdad de tiempos de polimerización, genera una mayor cantidad de polímero en el interior del capilar, mejorándose considerablemente la resolución de los picos. Por tratarse de un efecto meramente cinético, es de esperar que su influencia sea tanto menor cuanto mayor sea el tiempo de polimerización empleado. Así, se comprobó cómo el efecto de la concentración de iniciador fue mucho mayor en el caso de emplear





un tiempo de polimerización de 1 hora, siendo prácticamente despreciable para tiempos de polimerización de 2 horas.

Se ha observado asimismo que el empleo de tiempos de polimerización muy largos claramente conduce a problemas de transferencia de masa de los analitos hacia los huecos específicos generados en el polímero, que se traducen en una clarísima disminución tanto del índice normalizado de separación como de la resolución de los picos. Este hecho se intentó solventar mediante un incremento de la concentración de isooctano, para dotar a los monolitos de una mayor porosidad. En contra de lo esperado, el incremento en la cantidad de iso-octano condujo a un cambio morfológico en el polímero resultante que disminuyó drásticamente su porosidad.

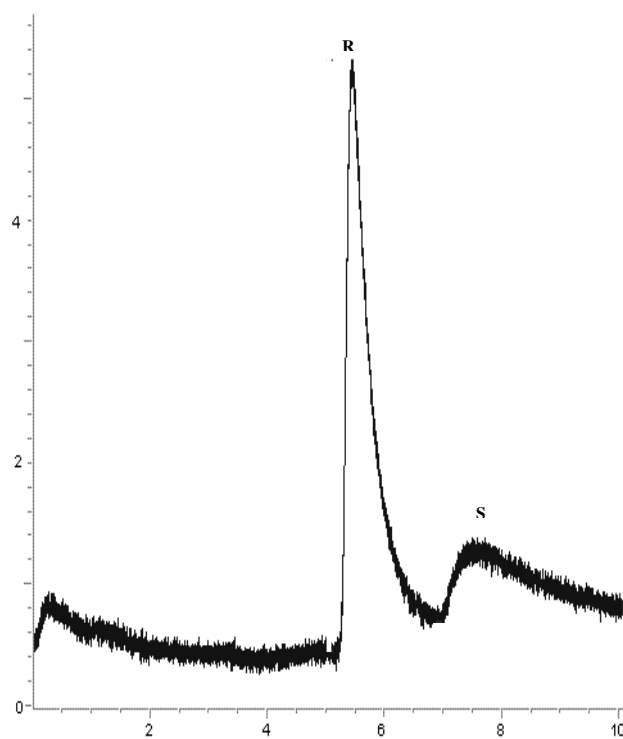
Por último, se ha observado que, dentro del intervalo de concentraciones evaluado, las condiciones óptimas corresponden a la mínima concentración de plantilla, puesto que de esta forma se favorecen tanto una mayor separación relativa de los enantiómeros como una mayor resolución al disminuir considerablemente la anchura de los picos.

En la figura 24 se muestra el electrocromatograma obtenido para la separación del racémico de propranolol (10  $\mu$ M) empleando las condiciones óptimas de polimerización que aparecen recogidas en la tabla 20.



**TABLA 20: Intervalo evaluado y condiciones óptimas  
obtenidas para la síntesis de los monolitos**

Parámetro	Intervalo evaluado	Óptimo
s-propranolol	15-30 $\mu\text{M}$	15 $\mu\text{M}$
Acido metacrílico	650-810 $\mu\text{M}$	730 $\mu\text{M}$
Trimetilolpropano trimetacrilato	650-810 $\mu\text{M}$	650 $\mu\text{M}$
Azo-bis-isobutironitrilo	22-44 $\mu\text{M}$	44 $\mu\text{M}$
Isooctano	5-6 %	6 %
Tiempo de polimerización	1-2 horas	1 hora



**Figura 24: Electrochromatograma obtenido para la separación del racémico de propranolol (10  $\mu\text{M}$ ) en el monolito óptimo.**

Fase móvil: Tampón fosfato (50 mM, pH 3.4):Acetonitrilo (20:80, v/v), voltaje: -2 kV, temperatura: 60°C



MIP2006: Fourth International Workshop on Molecularly Imprinted Polymers  
Cardiff, Reino Unido, 2006



Evaluation of thiabendazole-MIP monoliths as selective  
stationary phases in capillary electrochromatography

C. Cadete<sup>1</sup>, L. Schwach<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain  
<sup>2</sup> Analytical Development, AstraZeneca R&D Mölndal, SE-431 83 Mölndal, Sweden

INTRODUCTION

The attractive characteristics of molecularly imprinting and capillary electrochromatography are the prime motive for the merge of these techniques. The main advantages of MIP-CEC are the potentially high-effective liquid based separation system and the unique selectivity for predetermined molecular species by simple, rapid, environmental friendly and cost-effective means.

In the present work, different molecularly imprinted polymer monoliths have been evaluated as enantioselective stationary phases for the separation of propranolol enantiomers (Fig. 1) in capillary electrochromatography. Experimental design has been used in the optimization of the polymerisation procedure.

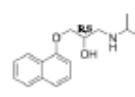
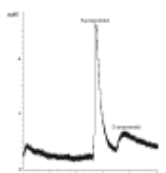


Fig. 1. Propranolol enantiomers



ELECTROCHROMATOGRAPHIC  
SEPARATION OF PROPRANOLOL  
ENANTIOMERS



Separation temperature: 60°C  
Power supply voltage: -2 kV  
Buffer composition:  
20% Phosphoric acid 25 mM pH 3  
80% Acetonitrile

Fig. 2. Electrochromatogram obtained for the separation of rac-propranolol under the optimum MIP-CEC conditions

POLYMERISATION OF THE IMPRINTED MONOLITHS

CAPILLARY DEACTIVATION TREATMENT

Capillaries were flushed with NaOH (5 mM) and pure water (2 min). After drying with a N<sub>2</sub> stream (5 min), a solution containing 15% of 2-trimethoxypropyltrimethacrylate in toluene was flushed for 5 min. The derivatization reaction was carried out for 2 hours at room temperature. Finally, capillaries were flushed with toluene (5 min).

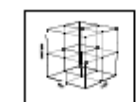
POLYMERIZATION

Capillaries were flushed with the polymerization solution for 5 min. Polymerization was carried out at room temperature under an UV source (30 min).

TEMPLATE REMOVAL

Template was removed by flushing with a solution containing methanol and acetic acid (9:1) immediately after polymerization.

OPTIMIZATION OF THE POLYMERISATION PROCEDURE



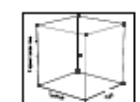
1.5-fractional factorial design

Variation of the parameters

Methacrylic acid: 0.02-0.025 mM  
Trimethoxypropyl trimethacrylate: 0.02-0.02 mM  
Is-octane: 5-6%

Constant parameters

Template molecule (S-propranolol): 0.030 mM  
Acetic acid/ethanol: 0.022-0.044 mM  
Polymerization time: 2 hours



Central-DoE factorial design

Variation of the parameters

Template molecule (S-propranolol): 0.002-0.020 mM  
Acetic acid/ethanol: 0.022-0.044 mM  
Polymerization time: 1-2 hours

Constant parameters

Methacrylic acid: 0.02 mM  
Trimethoxypropyl trimethacrylate: 0.02 mM  
Is-octane: 6%

CONCLUDING REMARKS

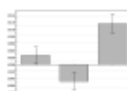
OPTIMUM SYNTHESIS CONDITIONS:

Minimum POLYMERIZATION TIME: 1 hour  
Minimum CROSSLINKER concentration: 0.02 mM  
Minimum TEMPLATE concentration: 0.017 mM

Maximum AIBN concentration: 0.044 mM  
Maximum ISOCTANE content: 6%

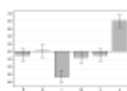
Correlate with FUNCTIONAL MONOMER concentration? Even if an increase on functional monomer concentration increases the normalized separation index, it will considerably reduce the resolution

Effect of the different parameters on the Normalized Separation Index



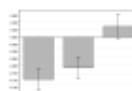
R = 0.987 Q = 0.916

Effect of the different parameters on the Normalized Separation Index



R = 0.998 Q = 0.915

Effect of the different parameters on the Resolution



R = 0.977 Q = 0.932

Effect of the different parameters on the Resolution



R = 0.982 Q = 0.7

ACKNOWLEDGMENTS

C. Cadete wishes to thank Comunidad de Madrid for a predoctoral fellowship



## **5.2. - DETERMINACION DE TIABENDAZOL EN CITRICOS**

Se ha aplicado la metodología descrita en el apartado anterior para sintetizar monolitos impresos en el interior de columnas capilares, con la finalidad de emplearlos como fases estacionarias selectivas para la determinación de benzimidazoles. Esta metodología permite unificar las etapas de limpieza de la muestra y separación de los analitos. Al igual que en el caso de los monolitos impresos con s-propranolol, se pretende conseguir una estructura macroporosa de los monolitos, que permita el bombeo hidrodinámico de las disoluciones a través del polímero, facilitando de esta forma la regeneración de la columna y el intercambio de las distintas fases móviles.

La puesta a punto del método ha requerido la optimización de múltiples parámetros que afectan tanto al reconocimiento selectivo del polímero impreso como a la separación. Los factores que se han tenido en cuenta para la optimización de ambos procesos han sido la eficacia de la separación y el factor de impresión, calculado como el cociente entre los factores de reparto del tiabendazol en polímeros impreso y no impreso.

La optimización de las condiciones electrocromatográficas se ha basado en el estudio del efecto que tienen diferentes parámetros sobre la retención selectiva del tiabendazol en el polímero impreso. Así, partiendo de unas condiciones bibliográficas para la síntesis del polímero impreso mediante las que se sabe que existe reconocimiento selectivo para benzimidazoles, ha sido posible optimizar, entre otros, la naturaleza de la fase móvil, la concentración y naturaleza del electrolito, la temperatura y el potencial de trabajo.

Una vez obtenidas las condiciones óptimas para el reconocimiento selectivo de los benzimidazoles mediante electrocromatografía capilar, se ha optimizado el procedimiento empleado para la síntesis de los monolitos, para lo cual se han evaluado parámetros tales como el tiempo de polimerización y la concentración de los

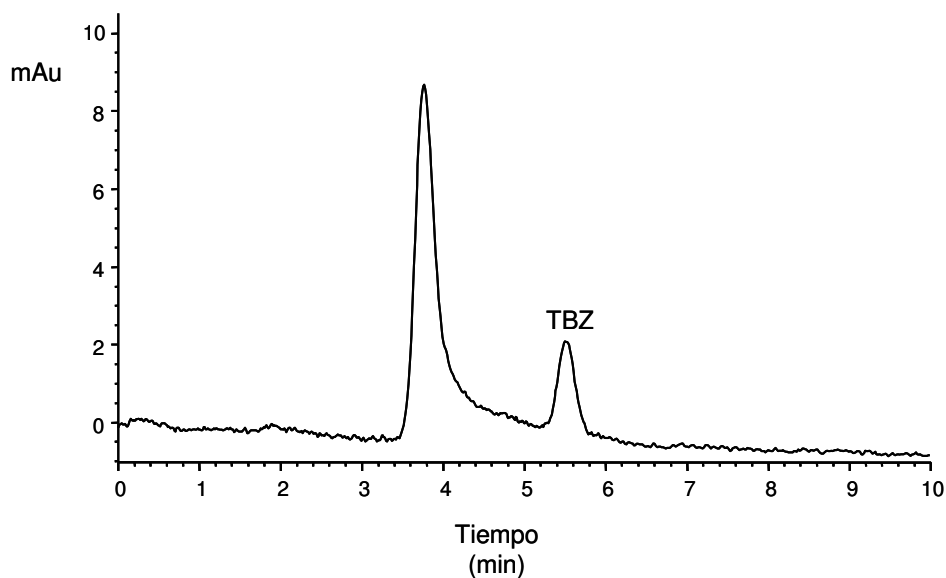


compuestos que forman parte de la mezcla de polimerización: analito plantilla, iniciador, monómero, entrecruzante e isooctano.

Una vez obtenidas las condiciones óptimas, el método desarrollado se ha aplicado a la determinación de tiabendazol en muestras de cítricos (limón y naranja) a niveles de concentración inferiores a los límites máximos legislados (5 mg/L). La elevada selectividad del método desarrollado permite la separación del tiabendazol del resto de componentes de la matriz.

Dicha separación hace posible llevar a cabo directamente los análisis de los extractos de las muestras sin necesidad de someterlos a ninguna etapa previa de limpieza, siendo únicamente necesario filtrarlos antes de su inyección en el capilar. De esta forma, no sólo se minimiza la manipulación de la muestra, sino que se pueden acortar considerablemente los tiempos requeridos para los análisis.

En la figura 25 se muestra el electrocromatograma obtenido para la determinación de tiabendazol en una muestra de piel de limón enriquecida con 5 mg/kg de este compuesto.



**FIGURA 25:** *Electrocromatograma obtenido para la determinación de tiabendazol (5 mg/kg) en una muestra enriquecida de piel de limón.*

**Fase móvil:** *Acido cítrico:Acetonitrilo (4:96, p/v), voltaje: -2 kV, temperatura: 60°C*



Este trabajo se ha publicado en la revista Journal of Chromatography A bajo el título *“Molecularly imprinted capillary electrochromatography for selective determination of thiabendazole in citrus samples”*. Asimismo, se ha presentado en el congreso MIP2006: Fourth International Workshop on Molecularly Imprinted Polymers (Cardiff, Reino Unido, 2006).

# Molecularly imprinted capillary electrochromatography for selective determination of thiabendazole in citrus samples

Carmen Cacho<sup>a</sup>, Leif Schweitz<sup>b</sup>, Esther Turiel<sup>c</sup>, Concepción Pérez-Conde<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain*

<sup>b</sup> *Analytical Development, AstraZeneca R&D Mölndal, SE-431 83 Mölndal, Sweden*

<sup>c</sup> *Departamento de Medio Ambiente, INIA, Carretera de A Coruña Km. 7.5, 28040 Madrid, Spain*

Received 14 September 2007; received in revised form 9 November 2007; accepted 28 November 2007

Available online 3 December 2007

## Abstract

In this work, the suitability of the combination of molecular imprinting and capillary electrochromatography (MIP-CEC) to be used as powerful tool in environmental or food analysis has been for the first time studied and successfully demonstrated. A molecularly imprinted monolith (MIM) has been synthesised and evaluated as stationary phase for the selective determination of the fungicide thiabendazole (TBZ) in citrus samples by non-aqueous capillary electrochromatography. The influence of the mobile phase composition, the voltage of the power supply and the separation temperature on the recognition of TBZ by the imprinted polymer has been evaluated, and the imprint effect in the MIM was clearly demonstrated. Once optimum recognition conditions were established, other variables affecting mechanical properties and chromatographic performance of MIM were adjusted using computational approach. The high selectivity achieved by the MIP-CEC developed procedure allowed unambiguous detection and quantification of TBZ in citrus samples by direct injection of the crude sample extracts, without any previous clean-up, in less than 6 min. The developed method was properly validated and the calculated detection limits were below the established maximum residue limits (MRLs), clearly demonstrating the suitability of the method to be used for the control of the selected fungicide.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Molecularly imprinted polymers; Capillary electrochromatography; Monolith; Thiabendazole; Citrus samples

## 1. Introduction

Molecularly imprinted polymers (MIPs) are synthetic materials having a predefined selectivity for the compound for which they were designed. During last decade MIPs have demonstrated a great potential as selective sorbents and have been widely used for the clean-up of several samples in solid-phase extraction processes [1–3], namely molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE). However, the literature available on the use of MIPs as selective stationary phases in electrochromatographic separations is not so wide and has been recently reviewed [4,5]. The adaptation of molecular imprinting technology to capillary electrochromatography (CEC) enables a selective and highly effective separation system. For some applications, MIP-CEC might allow separating the analytes from matrix components

directly into the capillary, thus avoiding the necessity of performing the clean-up steps that use to be mandatory in the analysis of complex samples, which obviously would considerably diminish the total analysis time [6].

In recent years, research in MIP-CEC has mainly focused on improving the synthesis procedures of the imprinted capillary columns. Several formats have been described, among them packed capillary columns [7], MIP entrapment in acrylamide or silica networks [8], surface grafted MIP particles [9], monoliths [10,11], capillary coatings [12] or partial filling of the capillary column with MIP nanoparticles of imprinted polymer [13] have been the most successful. Thus far, the use of imprinted capillary columns as stationary phases in capillary electrochromatography has mainly dealt with enantiomer separations [4,14–16], since their identical chemical properties and electrophoretic behaviour prevents their separation by CE, CEC or HPLC using conventional stationary phases. However, the use of imprinted capillary columns for other applications (i.e. analysis of contaminants in complex samples) has not yet been

\* Corresponding author. Fax: +34 913944329.

E-mail address: [cpconde@quim.ucm.es](mailto:cpconde@quim.ucm.es) (C. Pérez-Conde).

reported and would be highly desirable for the further development of this technique.

In the present work, the synthesis and use of an imprinted monolithic capillary column for the non-aqueous capillary electrochromatographic determination of the fungicide thiabendazole (TBZ) in citrus samples is presented. Benzimidazoles, and specially TBZ, are among the most commonly used post-harvest systemic fungicides for the control of diseases during fruit and vegetable storage and distribution. Due to its ability to reach the edible parts of food [17], maximum residue limits (MRLs) have been established for benzimidazoles in the range from 0.05 to 15 mg kg<sup>-1</sup>, depending upon the crop [18]. Therefore, analytical methods able to detect TBZ at this low concentration level are necessary. In addition to the unavoidable extraction step, the existing methods for determination of TBZ in fruit samples include tedious and time-consuming liquid–liquid or solid-phase extraction processes for the clean-up of extracts in order to permit analysis by liquid chromatography using either UV, fluorescence or MS detection [19–21]. Keeping all these comments in mind, the main aim of the present work was the development of a MIP-CEC method for the determination of TBZ in crude fruit sample extracts at concentration levels below the established MRLs.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals

Methacrylic acid (MAA), ethylene glycol dimethacrylate (EDMA), 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) and [(methacryloxy)propyl]trimethoxysilane were purchased from Sigma–Aldrich Química (Madrid, Spain). Thiabendazole (TBZ), was purchased from Riedel de Haen (Seelze, Germany). Stock standard solution (1000 mg L<sup>-1</sup>) was prepared in acetonitrile and stored at -18 °C. All chemicals were used without any further purification steps.

Purified water was obtained from a Milli-Q water system purchased from Millipore Ibérica (Madrid, Spain) and HPLC grade solvents (acetonitrile, toluene, *iso*-octane, acetic acid and methanol) were obtained from Scharlab (Barcelona, Spain).

### 2.2. Preparation of molecularly imprinted capillary columns

Fifty centimetres of long fused-silica capillaries with UV-transparent protecting polymer coating (100 µm I.D. × 375 µm O.D.) were obtained from Composite Metal Services (Ilkley, UK). Capillaries were derivatised by flushing subsequently 1 M NaOH (3 min), purified water (3 min), argon (5 min) and a solution of 15% [(methacryloxy)propyl]trimethoxysilane in toluene (5 min) at a flow rate of 50 µL min<sup>-1</sup>. After 2 h reaction, capillaries were washed with toluene (5 min) and stored at room temperature until use. The detection window was prepared by removing a part of the protecting polymer coating 8.5 cm from one end.

A pre-polymerization mixture containing the template molecule (TBZ, 15 µM), functional monomer (MAA, 60 µM), cross-linker (EDMA, 300 µM) and initiator (AIBN, 6 µM) dis-

solved in a toluene:*iso*-octane (96:4) solution was prepared. The pre-polymerization mixture was introduced into the capillary with the help of a syringe, and the capillary ends were sealed by soft plastic rubber. The long end of the capillaries and the detection window were masked with aluminium foil to prevent polymerization in these zones. Thus, polymerization was carried out only in the short end of the capillary column, and the detection window was placed immediately after the monolith. Capillaries were irradiated with a UV-lamp (Sigma–Aldrich) at room temperature for 1.5 h and subsequently flushed with 25 mL of methanol–acetic acid (1:1) for template removal.

### 2.3. Sample preparation

A volume of 40 mL of acetonitrile was added to 10 g of sample and the mixture was sonicated for 30 min. The supernatant was filtered through a 0.45 µm nylon filter, and the extracts were evaporated to dryness in a Univapo Concentrator systems from Biogen Científica (Madrid, Spain) and redissolved in 1 mL of acetonitrile for the analysis by MIP-CEC.

### 2.4. Capillary electrochromatography

All measurements were performed with a capillary electrophoresis system HP 3D CE (Agilent Technologies, Madrid, Spain) equipped with a diode array detector and controlled by an HP Vectra VL computer and an HP Chemstation program manager.

Capillaries were initially flushed for 15 min with the electrolyte solution consisting on a solution of citric acid in acetonitrile (4% w/v, pH 4.6), and then equilibrated by applying a voltage of 10 kV until a stable current and baseline was achieved (20 min). Both the electrolyte and the samples were sonicated for 15 min prior to use. Injection was done electrokinetically (2 kV, 10 s), and the separation voltage applied was 2 kV. The column was thermostated at 60 °C. UV detection was performed at 305 nm, with reference wavelength of 450 nm.

### 2.5. HPLC

HPLC measurements were performed with a HPLC from Thermo Separation Products consisting of a ConstaMetric 4100 Series high pressure pump, a Spectro Monitor 5000 photo diode-array detector and a Rheodyne 7725i injection valve equipped with a 100 µL loop and a Hypersil ODS column (250 mm × 4.6 mm I.D., 5 µm). Thiabendazole was eluted in an isocratic mode with an acetonitrile: 0.02 M sodium dihydrogen phosphate (pH 3.3) 6:4, monitored at 305 nm and quantified by external calibration using peak area measurements.

## 3. Results and discussion

As has been previously stated in Section 1, several column formats have been described for the synthesis of imprinted capillary columns. Among them, from our point of view, monolithic capillary columns are one of the best approaches. Main advantages of this format are the relatively high amount of MIP



stationary phase that can be created inside the capillary and the high porosity that can be provided to the obtained monoliths, allowing easy regeneration of the column and facilitating solvent exchange by hydrodynamic pumping [22]. The development of a MIP monolith based CEC method involved the optimization of several parameters influencing both mechanical properties of the monoliths and molecular recognition involved in the separation process. According to the previously reported works on MIM for CEC [22–24], the best way to carry out method optimization involves three linked steps: (i) finding a proper porogenic mixture using which a highly porous monolith can be obtained; (ii) optimization of experimental parameters involved in the recognition process and selective retention of TBZ in the MIP capillary columns (i.e. mobile phase composition, pH, voltage); and (iii) readjusting concentration and ratio of the pre-polymerization mixture to improve separation performance.

### 3.1. Selection of the porogenic mixture

The porosity of the imprinted monoliths must be controlled in order to allow capillary flushing without significant backpressures. The porogenic mixture has to be selected in terms of both the solvation of the polymer chains in the reaction medium and their ability to form efficient molecular imprints. In this sense, the use of *iso*-octane:toluene mixtures have demonstrated to be an easy way of controlling the porosity of the monoliths [10,23,24].

For this first study, the ratio and amount of reagents contained in the polymerization mixture were fixed according to a previously reported synthesis procedure that proved to be suitable for the preparation of a TBZ imprinted stationary phase for HPLC [25]. A set of MIP capillary columns based on several polymerization mixtures prepared in toluene containing increasing contents of *iso*-octane (from 0 to 7%) were synthesized, and the hydrodynamic properties were evaluated by connecting the capillaries to an HPLC or CE system. MIP capillary columns prepared using contents of *iso*-octane from 3 to 5% allowed HPLC pumping throughout. However, only the monolith prepared using 4% *iso*-octane had the appropriate porosity to allow capillary flushing in the CE system without significant backpressure. When either lower or higher concentrations of *iso*-octane were used, a dense monolith was obtained preventing their use in the capillary electrophoresis equipment and thus 4% composition was selected as optimum for the synthesis of the ulterior monoliths.

### 3.2. Selective retention of TBZ in the MIP capillary columns

As mentioned in Section 1, the main aim of this work is to obtain a CEC selective stationary phase to be used for the separation of TBZ from matrix-interfering compounds in complex samples directly into the MIP capillary column. To achieve that, those variables most influencing selective retention of TBZ in the imprinted monolith have to be optimized. First, the influence of the organic solvent used as mobile phase on the selective retention of TBZ by the imprinted monolith was evaluated. Methanol,

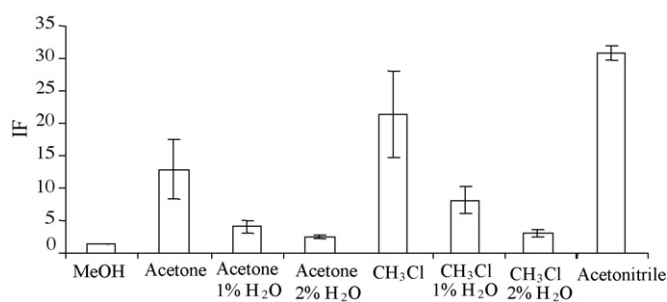


Fig. 1. Influence of the organic solvent used as mobile phase on the selective recognition of TBZ by the imprinted polymer.

acetone, chloroform and acetonitrile were selected for this study and parallel experiments using MIP and non-imprinted (NIP) capillary columns were carried out. A voltage of 2 kV and a temperature of 60 °C were used in all cases. One milligram per litre of thiabendazole standard was prepared in purified water and injected hydrodynamically in the capillaries (–50 mbar, 10 s). The corresponding retention factors ( $k = (t_{\text{TBZ}} - t_{\text{EOF}})/t_{\text{EOF}}$ ) for TBZ in both capillaries were determined and imprinting factors ( $\text{IF} = k_{\text{MIP}}/k_{\text{NIP}}$ ) were calculated in all cases. The obtained results are shown in Fig. 1.

The retention and  $k$  values obtained for TBZ in methanol in the MIP and NIP capillary columns were similar, thus resulting in the lowest IF values. These results suggested that this solvent completely disrupts the selective interaction of TBZ with the imprinted monolith, due probably to the protic and polar characteristics of this solvent. Using either acetone or chloroform provided higher IFs, clearly demonstrating the presence of selective binding sites in the MIP monoliths. However, and as can be appreciated by the large error bars obtained (RSDs higher than 30% in both cases), the current of the CE system in those conditions was quite unstable, leading to an important lack of reproducibility of retention times. The introduction of small amounts of water as modifier in the acetone or chloroform mobile phases helped to stabilize the electroosmotic flow within the capillaries. However, the imprinting factor in these conditions considerably diminished, being both solvents thus finally discarded. In contrast, using acetonitrile provided very satisfactory results, since not only a very high imprinting factor was obtained but also a good stability of the generated current, allowing to reduce RSDs values below 5%, and thus, this solvent was selected as optimum.

However, the obtained retention time of TBZ in the MIP capillary column in these conditions was rather high (>15 min) and the peak obtained showed an important tailing. Peak tailing is a common problem associated to MIP stationary phases, mainly due to the slow adsorption/desorption equilibrium. Thus, and in order to both improve the peak shape and reduce analysis time, the possibility of adding small amounts of acid solutions to the acetonitrile mobile phase was evaluated. It was expected that an acidic media would diminish the strength of the selective interaction of TBZ with binding sites thus facilitating analyte desorption. Consequently, phosphoric acid, acetic acid, formic acid and citric acid were selected for this study and different solutions of acetonitrile containing 2% (w/v) of these acids were

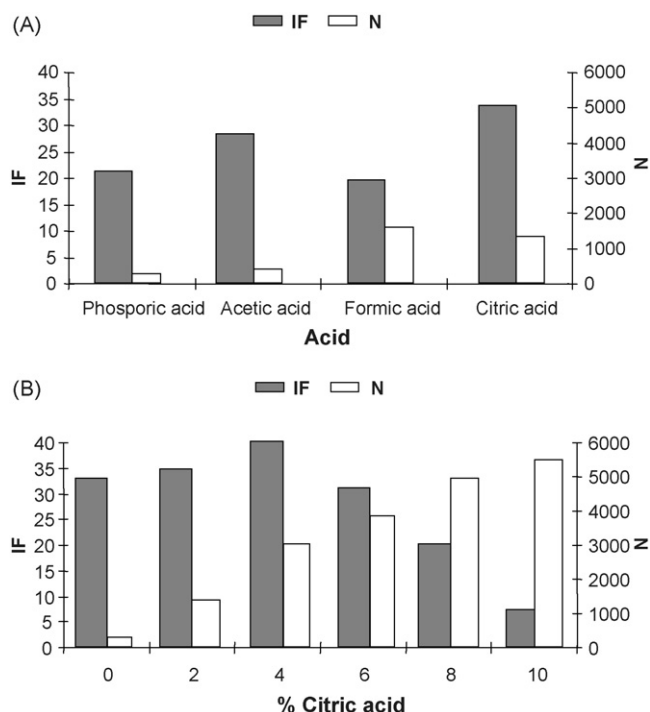


Fig. 2. Influence of the acid nature (A) and the concentration of citric acid (B) used as mobile phase-modifier on the imprinting factor and the efficiency of the imprinted monolith. Total length: 50 cm, effective length: 8.5 cm, voltage: 2 kV.

prepared and evaluated as mobile phases for MIP-CEC. Fig. 2A shows the effect of the different acids tested as modifiers both on the IF and the efficiency (expressed as theoretical plate number  $N$  obtained). As can be observed, the effect on efficiency greatly depends on the nature of the acid evaluated. Among them, citric acid was selected as optimum modifier since it provided the higher imprinting factor and a high efficiency. This acid not only favoured analyte desorption, but also acted as an excellent electrolyte support in the non-aqueous capillary electrophoresis system [26]. Next, and with the aim of further improving peak tailing, the amount of citric acid added was optimized by performing experiments using mobile phases containing increasing amounts of citric acid. Results are shown in Fig. 2B. As can be seen on it, the efficiency increases when the acid contents increases. However, for acid contents above 4%, the selective interaction of TBZ with the binding sites starts to be affected thus decreasing of the obtained IFs. Consequently a compromise of 4% citric acid was established, since using these conditions allowed an adequate recognition on the imprinted polymer with narrow peaks in a relatively short analysis time.

Once the mobile phase was optimized, the effects of other variables, such as separation temperature and voltage of the power supply on the recognition of TBZ by the MIP monolith were evaluated. Temperature was studied from 20 to 60 °C (highest value given by the instrument) and voltage among 1 and 6 kV. Results are depicted in Fig. 3. As can be observed, increasing temperature increases both IF and  $N$ , but also, the retention time was also considerably reduced. Consequently, 60 °C was selected as optimum working temperature. Concerning the voltage of the power supply, opposite effects of this parameter were

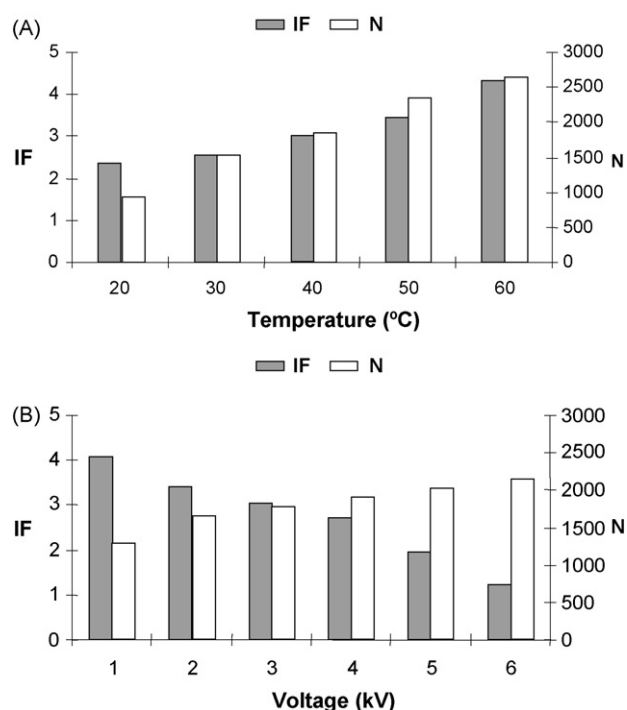


Fig. 3. Effect of the temperature (A) and power supply voltage (B) on the imprinting factor and the efficiency of TBZ on the imprinted monolith.

observed on IF and peak efficiency. On the one hand, it was found that increasing voltage of power supply decreased the imprinting factor. This fact can be attributed to the consequent increase of the electroosmotic flow that probably leads to the difficulty in mass transfer of thiabendazole to the selective binding sites. However, and although 1 kV provided the higher imprinting factor, the analysis time considerably increases reducing also peak efficiency. Consequently, a compromise shall thus be achieved and a voltage of 2 kV was finally selected for further experiments.

### 3.3. Concentration and ratio of polymerization mixture

Once the experimental parameters involved in the recognition process and selective retention of TBZ in the MIP capillary columns were optimized, the effect of concentration and ratio of the pre-polymerization mixture in the separation performance was finally studied and optimized. With this purpose, a factorial experimental design was used for evaluating the influence and optimizing concentration of initiator (A), template (B), functional monomer (C) and cross-linker (D). A set of imprinted monoliths were synthesized according to the polymerization mixtures showed in Table 1 and were evaluated in terms of IF and  $N$ . The obtained results are shown in Fig. 4.

From the obtained Pareto chart (Fig. 4A), which shows the amount of influence that each factor has on the response, it can be evidenced that the parameters that most influenced the monolith's performance were the initiator and TBZ concentrations. The quadratic terms corresponding to combinations of A, B, C, and D (data not shown) were not significant, since the obtained values were lower than 0.25. The response sur-

Table 1  
Polymerization mixtures used in the synthesis of the different imprinted monoliths

Monolith	MAA ( $\mu\text{M}$ )	EDMA ( $\mu\text{M}$ )	TBZ ( $\mu\text{M}$ )	AIBN ( $\mu\text{M}$ )
1	30	150	7.5	3
2	30	150	15.0	6
3	30	150	22.5	9
4	30	300	15.0	3
5	30	300	22.5	6
6	30	300	7.5	9
7	30	450	22.5	3
8	30	450	7.5	6
9	30	450	15.0	9
10	60	150	15.0	3
11	60	150	22.5	6
12	60	150	7.5	9
13	60	300	22.5	3
14	60	300	7.5	6
15	60	300	15.0	9
16	60	450	7.5	3
17	60	450	15.0	6
18	60	450	22.5	9
19	90	150	22.5	3
20	90	150	7.5	6
21	90	150	15.0	9
22	90	300	7.5	3
23	90	300	15.0	6
24	90	300	22.5	9
25	90	450	15.0	3
26	90	450	22.5	6
27	90	450	7.5	9

face estimated from the factorial design for initiator and TBZ (showed in Fig. 4B) showed a maximum at concentrations of 6 and 15  $\mu\text{M}$  respectively and thus, those concentrations were selected as optimum. Concerning AIBN, higher concentrations

in the polymerization mixture led to broader peaks, which can be attributed to mass transfer problems of TBZ to the binding sites of the imprinted polymer. At lower AIBN concentrations, the amount of polymer created inside the capillary considerably diminished, and thus retention of TBZ was almost negligible. An increase in the concentration of template in the polymerization mixture led to an increased retention of thiabendazole on the imprinted monolith, and thus the imprinting factor considerably increased. However, and since peak efficiency dramatically decreased with increasing thiabendazole concentrations due to peak broadening, a compromise concentration of 15  $\mu\text{M}$  was selected to obtain the maximum imprinting factors without diminishing the peak efficiency.

Regarding MAA and EDMA, and since according to Pareto chart their influence in monolith performance was negligible at the concentration intervals evaluated, compared with that of AIBN or TBZ concentrations, concentrations were set as before in 60 and 300  $\mu\text{M}$ , respectively. Using higher concentrations of either the functional monomer or the cross-linker led into too dense monoliths preventing capillary flushing. The selected final optimum conditions give a monomer:template ratio of 4 and any further increase in the template concentration led to broader peaks.

Finally, the effect of the polymerization time on the performance of the imprinted monolith was also evaluated. Polymerization times ranging from 30 to 120 min were tested. Too low polymerization times yielded either a very low amount of polymer in the capillaries or no polymerization at all, and thus retention of TBZ in these conditions was negligible. However, a polymerization time of 120 min led to a considerable peak broadening being finally 90 min selected as optimum polymerization time.

Several authors [27–29] have claimed that the comparison of the imprinted and non-imprinted monoliths is not enough to ensure a selective separation of the analytes, since their different morphology can lead to a different electrochromatographic performance of both monoliths. In order to ensure that the differences observed are only due to the imprinting effect, a CE run was performed in similar conditions on an open capillary. Fig. 5 shows the electrochromatograms obtained for the retention of TBZ on the imprinted and the non-imprinted monoliths, together with that obtained using an open capillary. As can be clearly seen, the differences in the performance of both monoliths and the open capillary demonstrate the imprinting effect and the selective retention of TBZ on the imprinted monolith.

### 3.4. Method application and validation

#### 3.4.1. Application to direct analysis of crude citrus sample extracts

The developed MIP-CEC method was applied to the determination of TBZ in citrus samples extracts without performing any previous clean-up step. Lemon and orange samples were treated as described in Section 2. Sample extracts, both spiked and non-spiked with TBZ, were injected directly onto the MIP-CEC column without any previous clean-up step being applied. Lemons and oranges were peeled and both peel and pulp were

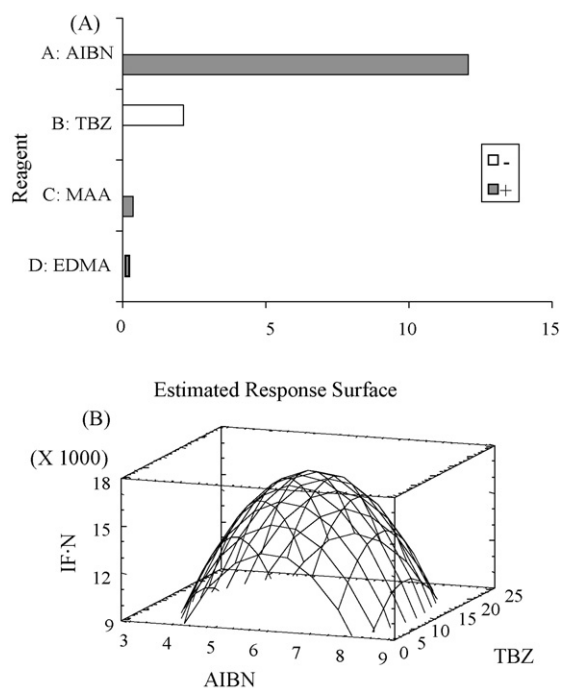


Fig. 4. (A) Pareto chart and (B) estimated response surface for initiator and TBZ concentrations on the performance of the imprinted monolith.

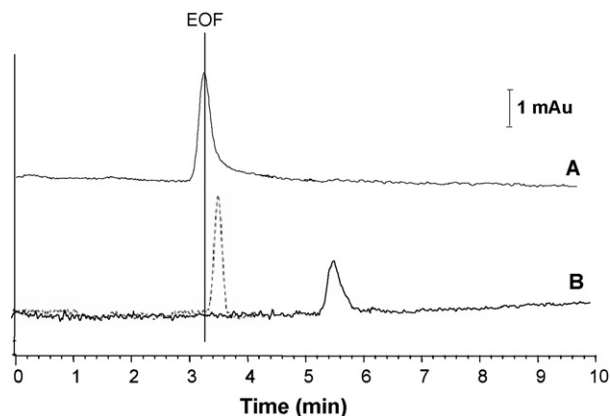


Fig. 5. Electropherograms obtained in the analysis of TBZ ( $3 \text{ mg L}^{-1}$ ): normal capillary electrophoresis (A) and capillary electrochromatography (B) on an imprinted monolith (solid line) and non-imprinted monolith (dashed line) in the optimum conditions.

analyzed independently. The spiking level was set at  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  which is the MRL of TBZ in these samples.

Mean recoveries and relative standard deviations (RSDs) obtained (five replicate samples) are shown in Table 2, and Figs. 6 and 7 show the electrochromatograms corresponding to the analysis of spiked lemon and orange samples, respectively (no peak at the retention time of TBZ was found in any of the non-spiked samples). As can be observed, the high selectivity provided by the imprinted monolith allowed retention and thus direct separation of TBZ from the matrix compounds to be performed inside the MIP capillary in all cases. TBZ could be unambiguously detected and quantified in the crude sample extracts in less than 6 min. Comparison of the UV spectra recorded for spiked samples with that of a TBZ standard solution was performed using the software comparison tool, and match factors obtained were always higher than 97.0%. Besides, quantitative recoveries ( $\geq 85\%$ ) were obtained in all cases with RSDs values lower than 6%, proving the suitability of the developed MIP-CEC method for reliable determination of TBZ in citrus samples.

### 3.4.2. Linearity and matrix effect

The linearity of the developed method was established by performing both external calibration and standard addition with lemon and orange samples spiked with TBZ in concentra-

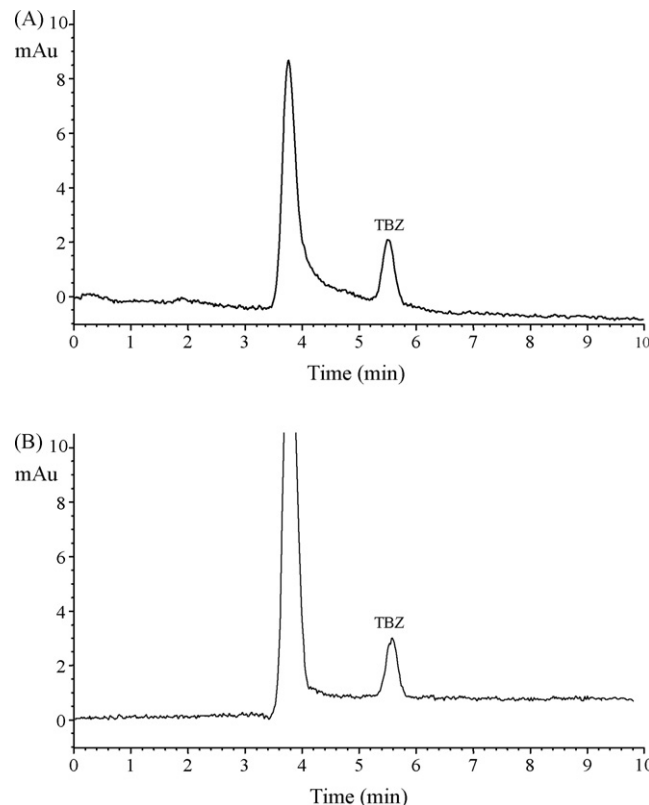


Fig. 6. Electrochromatograms obtained for lemon peel (A) and pulp (B) samples spiked with TBZ ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) by the proposed MIP-CEC method. Voltage: 2 kV, temperature:  $60^\circ\text{C}$ , electrolyte: citric acid/acetonitrile (4%, w/v).

tions varying from  $0.05$  to  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  of TBZ. The MIP-CEC method was linear in the range of concentrations studied and the regression analysis correlation coefficients obtained varied from 0.9940 to 0.9998, depending on the sample. No significant differences ( $\alpha=0.05$ ) between the slopes of the external and standards addition calibration curves were found, proving that there was not matrix effect for any of the studied samples, thus allowing external calibration to be used in this method.

### 3.4.3. Precision and recovery

Four different spiking levels covering the previously determined operation range were selected for this study. Precision of the method was evaluated both for the recoveries and the retention times of TBZ in the MIP-CEC column. Five sample

Table 2

Summary of the results obtained in the evaluation of method recovery (%recovery) and precision (RSD) for  $n=5$  (RSD<sub>tr</sub>: Relative standard deviation of retention times)

Sample	1 mg kg <sup>-1</sup>			5 mg kg <sup>-1</sup>			10 mg kg <sup>-1</sup>			15 mg kg <sup>-1</sup>			LOD (mg kg <sup>-1</sup> )	LOQ (mg kg <sup>-1</sup> )
	%Recovery	RSD	RSD <sub>tr</sub>	%Recovery	RSD	RSD <sub>tr</sub>	%Recovery	RSD	RSD <sub>tr</sub>	%Recovery	RSD	RSD <sub>tr</sub>		
Lemon														
Peel	95	4.3	1.3	89	4.6	1.9	87	4.8	2.4	93	5.0	1.7	0.04	0.14
Pulp	97	5.8	2.1	91	6.0	2.0	103	5.1	1.6	95	4.1	1.1	0.04	0.14
Orange														
Peel	103	6.2	1.6	85	4.4	2.6	102	4.9	0.9	92	6.9	1.4	0.05	0.18
Pulp	105	4.9	1.8	93	4.8	1.7	93	5.3	2.3	89	5.5	1.9	0.04	0.17

Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) calculated for the different samples.

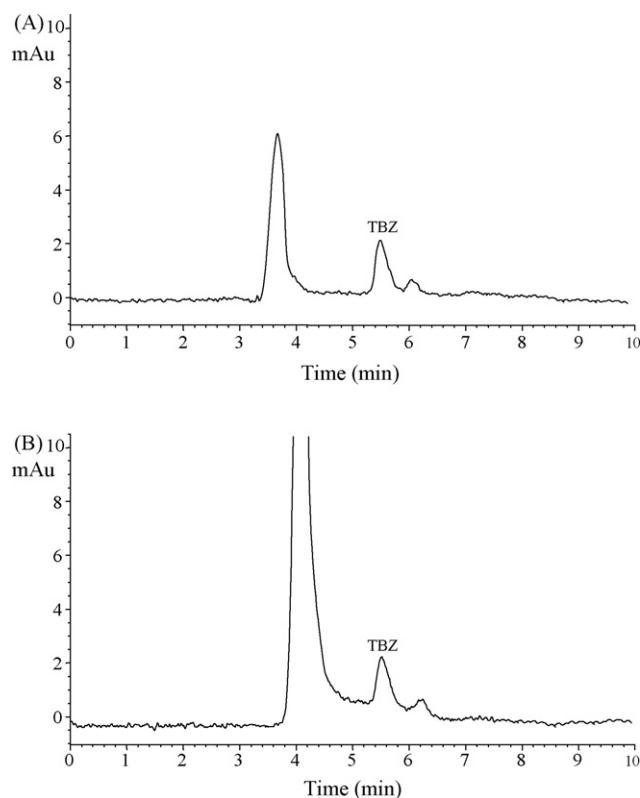


Fig. 7. Electrochromatograms obtained for orange peel (A) and pulp (B) samples spiked with TBZ ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) by the proposed MIP-CEC method. Voltage: 2 kV, temperature:  $60^\circ\text{C}$ , electrolyte: citric acid/acetonitrile (4%, w/v).

replicates of each concentration were prepared and analyzed by the proposed method in two different days and the obtained results are summarized in Table 2. The mean recoveries obtained were always quantitative within the range from 85 to 105%, with RSDs values below 7%. Concerning retention times the obtained RSDtr were very low, and ranged from 0.9 to 2.5%, confirming the good reproducibility of the developed method. It has to be mentioned that the monolith synthesis proved to be very reproducible, providing RSDs values for the retention time and the retention factor of TBZ lower than 4% in a set of three monoliths.

#### 3.4.4. Limits of detection and quantification

The limits of detection were calculated as three times the signal of the background noise obtained in the analysis of non-spiked samples at the retention time of TBZ. The limits of quantification were determined considering a value of 10 times the background noise. The obtained values were also included in

Table 3

Summary of results obtained in the evaluation of accuracy of the developed MIP-CEC method

Sample	Concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ )	HPLC-UV ( $\text{mg L}^{-1}$ )	MIP-CEC ( $\text{mg L}^{-1}$ )
Lemon sample extracts (peel) spiked with TBZ at various concentration levels	0.50	0.51	0.50
	1.00	1.00	0.99
	2.50	2.50	2.51
	5.00	5.01	4.99
	10.00	9.99	9.99

Table 2. As can be seen, limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) were in good agreement with the MRLs of TBZ in the selected samples and thus, it was clearly demonstrated that the proposed method allows the determination of TBZ at the concentration levels required by current legislation.

#### 3.4.5. Accuracy

The accuracy of the method was evaluated by comparing the results provided by the developed MIP-CEC method with those obtained following a previously reported HPLC procedure for the analysis of TBZ in citrus samples at different concentration levels. This method involved several liquid–liquid extraction purification steps of the citrus sample extracts [30].

Results are summarized in Table 3. As can be seen, there were not significant differences between both methods, thus demonstrating the accuracy of the developed MIP-CEC for the purpose of the analysis.

#### 3.4.6. Ruggedness

The ruggedness of the methods was evaluated by deliberately introducing small changes to the developed MIP-CEC procedure and examining the effect on the recoveries of TBZ. Table 4 summarizes the different parameters and values that were evaluated and the results obtained. As can be clearly seen, the recovery of TBZ remained unaffected in all the conditions tested.

From the overall results summarized in this section it is clear that the imprinted capillary column enables an easy and fast determination of TBZ contents in citrus samples at the concentration levels demanded by present-day legislation. The analysis of crude sample extracts can be performed in less than 6 min without needing any clean-up step.

#### 3.4.7. Cross-reactivity

A cross-reactivity study was performed by studying the interaction of carbendazim and benomyl, since these are among the

Table 4

Summary of results obtained in the evaluation of ruggedness of the developed MIP-CEC method

Parameter	Lower		Optimum		Higher	
	Value	% Recovery	Value	% Recovery	Value	% Recovery
Citric acid (%)	3.5	$98 \pm 3$	4	$99 \pm 2$	4.5	$99 \pm 3$
Potential (kV)	1.8	$97 \pm 2$	2	$97 \pm 3$	2.2	$98 \pm 2$
Temperature ( $^\circ\text{C}$ )	55	$98 \pm 1$	60	$99 \pm 2$	<sup>a</sup>	–

<sup>a</sup>  $60^\circ\text{C}$  is the highest temperature instrumentally available.



mostly used benzimidazole fungicides for crop protection. From this study, it was concluded that both benzimidazole fungicides were also retained by the MIP, suggesting its selectivity towards the benzimidazole substructure, regardless of the imidazole substituents. However, both compounds exhibited a much lower sensitivity, since the peak area of 5.0 or 5.7 mg L<sup>-1</sup>, respectively, was equivalent to that obtained for a 0.1 mg L<sup>-1</sup> solution of thiabendazole. Thus, the coexistence of either benomyl or carbendazim with thiabendazole would have a negligible effect on its quantification.

#### 4. Conclusions

A set of TBZ imprinted monoliths have been synthesized and used as stationary phases in capillary electrochromatography. All variables involved in both molecular recognition and performance of the imprinted capillaries have been studied in detail and optimized, and the imprinting effect in the obtained monolith has been clearly demonstrated.

The optimum imprinted monolith demonstrated to be suitable for the determination of TBZ contents in crude citrus sample extracts at the concentration levels required by nowadays legislation. It proved to be extremely selective, enabling retention and thus direct separation of TBZ from the matrix compounds to be performed inside the MIP capillary columns. The developed MIP-CEC method was successfully validated, and it has been clearly demonstrated that crude sample extracts can be directly injected without performing any prior clean-up step, allowing TBZ to be unambiguously identified and quantified in less than 6 min.

From the best of our knowledge, this is the first work in which the potential of combination of molecular imprinting with CEC has been exploited as routine methodology for the control of pollutant residues in food or environmental fields, thus opening new ways of application of MIP-CEC to solve practical problems in analytical laboratories.

#### Acknowledgements

The authors wish to thank DGICYT (CTQ2005-02281), Comunidad de Madrid (S-0505/AGR/0312) and Universidad Complutense de Madrid for financial support. C. C. wishes to

thank Comunidad de Madrid for a predoctoral fellowship. E. T. wishes to thank Ministerio de Educación y Ciencia for a Ramón y Cajal contract.

#### References

- [1] C. Alexander, H.S. Andersson, L.I. Andersson, R.J. Ansell, N. Kirsch, I.A. Nicholls, J. O'Mahony, M.J. Whitcombe, *J. Mol. Recogn.* 19 (2006) 106.
- [2] V. Pichon, K. Haupt, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 29 (2006) 989.
- [3] E. Caro, R.M. Marcé, F. Borrull, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 143.
- [4] Z.S. Liu, C. Zheng, C. Yan, R.Y. Gao, *Electrophoresis* 28 (2007) 127.
- [5] E. Turiel, A. Martín-Esteban, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 719.
- [6] J. Haginaka, *Bioseparation* 10 (2001) 337.
- [7] J.M. Lin, T. Nakagama, K. Uchiyama, T. Hobo, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 27 (1997) 1489.
- [8] G. Chirica, V.T. Remcho, *Electrophoresis* 20 (1999) 50.
- [9] C. Sulitzky, B. Rückert, A.J. Hall, F. Lanza, K. Unger, B. Sellergren, *Macromolecules* 35 (2002) 79.
- [10] L. Schweitz, L.I. Andersson, S. Nilsson, *Analyst* 127 (2002) 22.
- [11] Z.S. Liu, Y.L. Xu, H.F. Wang, C. Yan, R. Gao, *Anal. Sci.* 20 (2004) 673.
- [12] Y.C. Huang, C.C.Ch. Lin, C.Y. Liu, *Electrophoresis* 25 (2004) 554.
- [13] C. Nilsson, S. Nilsson, *Electrophoresis* 27 (2006) 76.
- [14] F. Qin, C.H. Xie, Z.Y. Yu, L. Kong, M.L. Ye, H.F. Zou, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1332.
- [15] R.J. Ansell, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1809.
- [16] G. Gubitz, M.G. Schmid, *Electrophoresis* 25 (2004) 3981.
- [17] Y. Ito, T. Goto, H. Oka, H. Matsumoto, Y. Miyazaki, N. Takahashi, H. Nakazawa, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 861.
- [18] <http://www.codexalimentarius.net>.
- [19] M. Michel, B. Gnusowski, B. Buszewski, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 29 (2006) 247.
- [20] B. Albero, C. Sánchez-Brunete, J.L. Tadeo, *J. AOAC Int.* 87 (2004) 664.
- [21] C. Jansson, T. Pihlstrom, B.G. Osterdahl, K.E. Markides, *J. Chromatogr. A* 1023 (2004), 1023, 93.
- [22] L. Schweitz, L.I. Andersson, S. Nilsson, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1179.
- [23] L. Schweitz, L.I. Andersson, S. Nilsson, *Anal. Chim. Acta* 435 (2001) 43.
- [24] L. Schweitz, L.I. Andersson, S. Nilsson, *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 401.
- [25] E. Turiel, J.L. Tadeo, P.A.G. Cormack, A. Martín-Esteban, *Analyst* 130 (2005) 1601.
- [26] A. Karbaum, T. Jira, *J. Biochem. Biophys. Methods* 48 (2001) 155.
- [27] C. Zeng, Z. Liu, R.Y. Gao, L. Zhang, Y. Zhang, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 1137.
- [28] Z.S. Liu, Y.L. Liu, C. Yan, R.Y. Gao, *J. Chromatogr. A* 1087 (2005) 20.
- [29] Z.S. Liu, Y.L. Liu, C. Yan, R.Y. Gao, *Anal. Chim. Acta* 523 (2004) 243.
- [30] Y. Chatani, T. Chikamoto, M. Munehisa, T. Adachi, M. Komatsu, *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 37 (1996) 187.



MIP2006: Fourth International Workshop on Molecularly Imprinted Polymers  
Cardiff, Reino Unido, 2006



Evaluation of thiabendazole-MIP monoliths as selective  
stationary phases in capillary electrochromatography (CEC)

C. Cacho<sup>1</sup>, L. Schweitz<sup>2</sup>, E. Turiel<sup>3</sup>, C. Pérez-Conde<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>2</sup> Analytical Development, AstraZeneca R&D Mölndal, SE-431 83 Mölndal, Sweden

<sup>3</sup> Departamento de Medio Ambiente, INIA, Carretera de A Coruña Km. 7.5, 28040 Madrid, Spain

INTRODUCTION

The attractive characteristics of molecularly imprinting and capillary electrochromatography are the prime motifs for the merge of these techniques. The main advantages of MIP-CEC are the potentially high-effective liquid based separation system and the unique selectivity for predetermined molecular species by simple, rapid, environmental friendly and cost-effective means.

In the present work, the MIP-CEC was optimized for the selective recognition of thiabendazole (TBZ). Both the mobile phase (acid content and type) and stationary phase (polymerization procedure) were optimized, as well as the power current supply and the separation temperature.

The optimum conditions were successfully applied to the analysis of thiabendazole fungicide in lemon sample extracts.

POLYMERISATION OF THE IMPRINTED MONOLITHS

CAPILLARY DERIVATISATION:

Capillaries were flushed with NaOH (1M) (3 min) and pure water (3 min). After drying with a N<sub>2</sub> stream (5 min), a solution containing 15% of 3-trimethoxysilylpropylmethacrylate in toluene was flushed for 5 min. The derivatisation reaction was carried out for 2 hours at room temperature. Finally, capillaries were flushed with toluene (3 min).

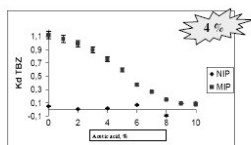
POLYMERISATION:

Capillaries were flushed with the polymerisation mixture for 5 min. Polymerisation was carried out at room temperature under an UV source (350 nm).

TEMPLATE REMOVAL:

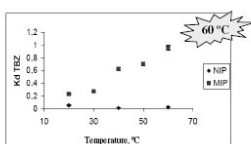
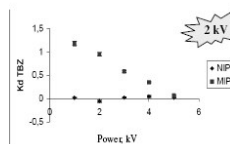
Template was removed by flushing with a solution containing methanol and acetic acid (1:1) immediately after polymerisation.

OPTIMIZATION OF THE MOBILE PHASE



Among the different  
acids evaluated,  
retention times were  
more reproducible  
with acetic acid

OPTIMIZATION OF THE POWER AND TEMPERATURE

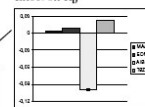


OPTIMIZATION OF THE POLYMERISATION PROCEDURE

Table 1.- Concentrations involved in the experimental design for the synthesis of the monoliths

	Concentration, $\mu\text{M}$		
MAA	30	60	90
EDMA	150	300	450
AIBN	3	6	9
TBZ	7.5	15	22.5

Effect on  $K_D$



Effect on TBZ retention time

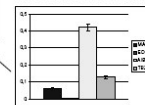
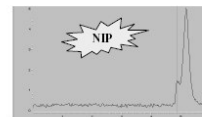
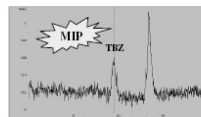
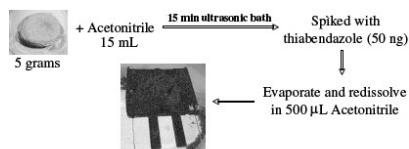


Table 2.- Optimization of the polymerization time

Time, min	$t_{R,TBZ}$ , min	$K_D$	Peak width, min
30	4.3	3.31	0.7
60	5.7	3.57	1.1
90	10.3	4.49	1.5
120	25.1	4.81	4.2

ANALYSIS OF THIABENDAZOLE IN LEMON EXTRACTS



Electrochromatograms obtained for the analysis of thiabendazole  
(10  $\mu\text{g/Kg}$ ) in lemon extracts

CONCLUDING REMARKS

- The optimum electrochromatographic conditions for the selective retention of thiabendazole in imprinted monoliths are:  
2 kV  
Acetonitrile:acetic acid (96:4)  
60°C
- The optimum polymerization procedure of the imprinted monoliths is:  
MAA (90  $\mu\text{M}$ )  
EDMA (450  $\mu\text{M}$ )  
AIBN (3  $\mu\text{M}$ )  
Thiabendazole (22.5  $\mu\text{M}$ )  
Acetonitrile:octane (96:4)  
90 min
- The imprinted monolith was successfully applied to the analysis of thiabendazole in lemon extracts (10  $\mu\text{g/Kg}$ )

ACKNOWLEDEMENTS

The authors wish to thank DGCYT (CTQ2005-02281), Comunidad de Madrid (S-0505/AGR/0312) and Universidad Complutense de Madrid for financial support. C. Cacho wishes to thank Comunidad de Madrid for a predoctoral fellowship. E. Turiel wishes to thank Ministerio de Educación y Ciencia for a Ramón y Cajal contract.

# *V. DISCUSIÓN INTEGRADORA*





El trabajo de investigación recogido en esta memoria surgió ante la necesidad de desarrollar nuevos métodos selectivos de tratamiento de muestras para la determinación de triazinas y benzimidazoles en distintas muestras de interés ambiental. Los polímeros generados por impresión molecular se caracterizan por su elevada selectividad y su estabilidad en medio orgánico, por lo que estos materiales se consideraron en principio idóneos para la consecución de este objetivo.

En el trabajo realizado se han puesto a punto diferentes métodos de limpieza y preconcentración de muestras basados en el empleo de polímeros de impresión molecular que han permitido llevar a cabo la determinación de triazinas y benzimidazoles en agua, suelo y muestras vegetales. Para ello, se ha evaluado la posibilidad de emplear estos polímeros tanto como adsorbentes selectivos en procesos de extracción en fase sólida como fases estacionarias selectivas en HPLC y electrocromatografía capilar.

### *1. - POLÍMEROS IMPRESOS CON PROPAZINA:*

#### *Determinación de triazinas en vegetales y suelos*

Tal y como se puede deducir de la revisión de métodos desarrollada en el apartado III.3.1., en la bibliografía se encuentran descritos numerosos métodos para la determinación de triazinas en muestras de agua. Sin embargo, su análisis en muestras más complejas con un elevado contenido en materia orgánica, como pueden ser los vegetales o los suelos, sigue siendo un reto en la actualidad. Aunque una vía para llevar a cabo dichos análisis es recurrir al empleo de los inmunoensayos, los métodos inmunoquímicos presentan serios inconvenientes como pueden ser su precio y la dificultad inherente a la obtención y manipulación de los anticuerpos. La posibilidad de utilizar MIPs se presenta como una excelente alternativa para evitar estos inconvenientes, manteniendo la elevada selectividad de los anticuerpos.

El principal objetivo de los **capítulos 1 a 3** de la presente Tesis Doctoral ha sido la puesta a punto de métodos basados en el empleo de polímeros de impresión molecular para la determinación de triazinas en muestras vegetales y de suelo. El punto de partida de esta investigación ha sido un trabajo anterior realizado por el grupo de investigación al que pertenezco, en el que se demostró que la utilización de los polímeros impresos permite la extracción selectiva de los analitos en matrices de elevada complejidad, lo que les confiere grandes ventajas respecto a otros tipos de adsorbentes (alquilsilicatos, estireno-divinilbencenos, carbón activo, etc) [1].

En dicho trabajo se demostró que la utilización de propazina como plantilla y ácido metacrílico permitía la obtención de polímeros capaces de reconocer selectivamente las triazinas más utilizadas. Igualmente, se optimizó el disolvente utilizado durante la polimerización (porogen), siendo éste tolueno. En este medio los porcentajes de recuperación de las triazinas fueron mucho más altos que los obtenidos con el polímero sintetizado con acetonitrilo (tabla 21). Al optimizar las condiciones de lavado, se demostró la total eliminación de las interacciones no específicas.

***TABLA 21: Porcentajes de recuperación de triazinas empleando polímeros impresos con propazina (MIP) y no impresos (NIP), sintetizados en acetonitrilo o tolueno [1]***

Triazina	MIP-AcN	NIP-AcN	MIP-Tol	NIP-Tol
Desisopropilatrizona	n.d.	n.d.	97	n.d.
Desetilatrizona	5	n.d.	98	n.d.
Simazina	9	n.d.	79	n.d.
Atrazina	15	n.d.	84	n.d.
Propazina	38	n.d.	90	n.d.

El polímero impreso sintetizado empleando tolueno como porogen se aplicó con éxito a la determinación de triazinas en muestras de agua y suelos. En muestras más complejas como los vegetales aún persistían diversas especies que interferían en la determinación de algunas de las triazinas evaluadas.

Como se ha mencionado en el apartado III.1.2., la polimerización por precipitación permite obtener polímeros más homogéneos que la polimerización en bloque, lo que en principio amplía su campo de aplicación. Por ello, en el **capítulo 1** de la presente Memoria se describe la síntesis y aplicación de un polímero no covalente análogo al anterior, que difiere únicamente de él en que la síntesis se llevó a cabo en presencia de un exceso de disolvente aplicando la metodología de polimerización por precipitación.

En primer lugar, se optimizaron las condiciones del proceso de extracción en fase sólida (carga, lavado y elución) para lograr la retención selectiva de las triazinas evaluadas (atrazina, simazina, propazina, prometrín, desisopropilatrazina y desetilatrazina). Para ello se partió de la hipótesis de que las interacciones inespecíficas son análogas en el polímero impreso y no impreso, lo que permitió seleccionar aquellas condiciones que eliminaran las interacciones inespecíficas sin sacrificar la interacción específica de las triazinas con el MIP.

Los disolventes empleados en la etapa de carga de las muestras en el polímero fueron tolueno, acetonitrilo y agua. El resultado de este estudio demostró la influencia de la polaridad del disolvente sobre la cantidad de triazinas retenidas por el polímero impreso. En este sentido, la retención de las triazinas era máxima en el caso de que la muestra se cargara en tolueno, disminuyendo a tan sólo un 50% cuando se cargaban en medio acuoso. Este hecho puede explicarse debido a la naturaleza de la interacción entre las triazinas y el polímero, la cual tiene lugar preferentemente mediante la formación de enlaces por puente de hidrógeno que, por lo tanto, están desfavorecidos en un medio polar.

La comparación del funcionamiento de los polímeros impreso y no impreso demostró una clara diferencia entre ambos cuando la muestra se cargaba en tolueno o acetonitrilo, mientras que presentaban un comportamiento análogo cuando la muestra se cargaba en agua, lo que indujo a pensar que las interacciones en este medio eran exclusivamente de naturaleza inespecífica.

En general, se ha observado que las máximas interacciones específicas con el polímero impreso se obtienen cuando la muestra se carga en un medio lo más parecido posible a las condiciones en las que se sintetizó el polímero. Como era de esperar, en nuestro caso se observó que la mayor diferencia en el comportamiento de ambos polímeros se obtuvo al cargar la muestra en tolueno. Este hecho obligó a evaporar los extractos de las muestras vegetales analizadas (preparados en acetonitrilo) y redissolver el residuo resultante en 1 mL de tolueno antes de cargarlo sobre el polímero impreso.

El siguiente paso de la optimización consistió en evaluar el efecto de diferentes disoluciones de lavado sobre el porcentaje de recuperación, tanto en el polímero impreso como en el polímero no impreso, con objeto de asegurar la total eliminación de las posibles interacciones inespecíficas. Este estudio se llevó a cabo variando la polaridad del medio de lavado. La disolución de lavado óptima resultó ser una mezcla de acetonitrilo:tolueno (20:80, v/v). El empleo de un mayor contenido de acetonitrilo conduce a una disminución de la recuperación final en el extracto procedente del polímero impreso probablemente debido a que la disolución es lo suficientemente polar como para eluir las triazinas retenidas, mientras que contenidos inferiores no permiten eliminar totalmente la interacción inespecífica de las triazinas al quedar retenidas en el polímero no impreso.

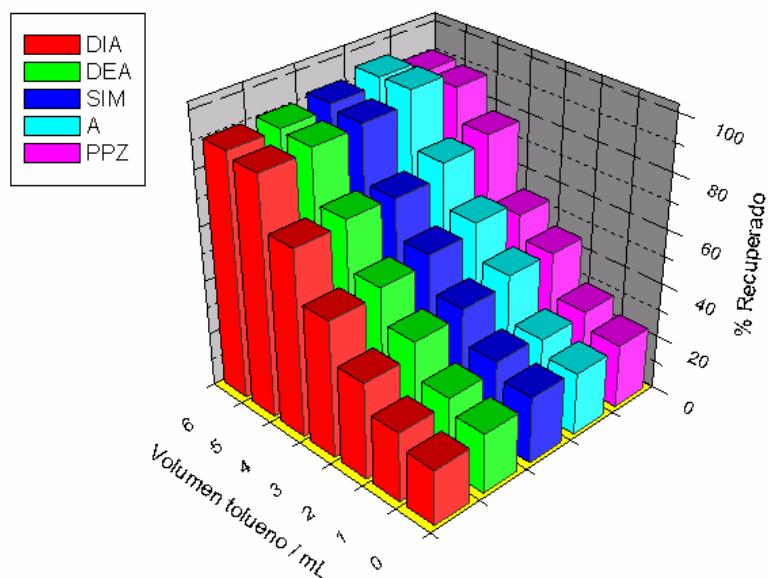
En estas condiciones, se obtuvieron recuperaciones cuantitativas en el polímero impreso, mientras que eran despreciables en el polímero no impreso, indicando la ausencia de interacciones inespecíficas para los analitos estudiados. La elución de las triazinas retenidas se realizó empleando 7 fracciones de 1 mL de metanol, si bien fue necesario incluir una primera fracción de 1 mL de acetonitrilo para arrastrar el tolueno empleado en la etapa de lavado, minimizando de esta forma la posible formación de una emulsión entre el tolueno empleado en la carga de la muestra y el metanol empleado en la elución de los analitos. Los extractos así obtenidos se evaporaron a sequedad y se redisolviaron en 1 mL de agua MilliQ para su cuantificación mediante HPLC-UV.

El procedimiento descrito se aplicó con éxito a la limpieza de muestras de guisantes, permitiendo obtener recuperaciones cuantitativas de todas las triazinas

evaluadas. No obstante, el análisis de otras muestras vegetales más complejas como el maíz o las patatas no pudo llevarse a cabo mediante este procedimiento, debido a que la coelución de algunos compuestos de la matriz interferían en la determinación de las triazinas. Por lo tanto, el análisis de estas muestras requirió de un procedimiento de limpieza más exhaustivo para eliminar dichas interferencias.

Una primera alternativa que permitiera la aplicación de los MIPs a la limpieza de muestras más complejas consistió en la introducción de una etapa previa de lavado de los extractos mediante el empleo del polímero no impreso, tal y como se describe en el **capítulo 1**. Brevemente, este procedimiento se basa en hacer pasar inicialmente los extractos de las muestras por el polímero no impreso, de forma que se retengan de forma no específica tanto los compuestos que interferían en el análisis como las triazinas. Para la elución de las triazinas del polímero no impreso se emplearon 5 mL de una disolución de acetonitrilo:tolueno (20:80, v/v), al haber confirmado que dicha disolución era capaz de eluir cuantitativamente las triazinas retenidas inespecíficamente en el polímero no impreso.

A continuación, estos extractos se deben cargar en el polímero impreso, pero teniendo en cuenta que la recuperación de las triazinas en el proceso MISPE era considerablemente superior al cargar la muestra en tolueno que cuando ésta se realizaba en acetonitrilo, era de esperar una disminución de la recuperación al cargar el extracto (acetonitrilo:tolueno 20:80) sobre el polímero impreso. Por ello, se evaluó el efecto que la adición de tolueno al extracto procedente del polímero no impreso tenía sobre la recuperación final de las triazinas. Como puede observarse en la figura 26, la recuperación aumentó a medida que se añadía tolueno, obteniéndose recuperaciones cuantitativas cuando el extracto procedente del NIP se diluía con 5 mL de tolueno antes de cargarlo en el MIP.



**FIGURA 26:** % recuperación de diferentes triazinas en el MIP en función del volumen de tolueno empleado en la dilución del extracto procedente del NIP

El proceso completo (NIP+MIP) ha permitido eliminar la mayor parte de las interferencias y lograr unos extractos considerablemente más limpios, permitiendo llevar a cabo la cuantificación de las triazinas presentes en muestras de maíz y patatas. Además, al cargar matrices más limpias en el polímero impreso su vida útil aumentó, pudiéndose reutilizar durante al menos 50 veces sin que su funcionamiento se viera afectado, en comparación con los 5 ciclos de vida útil que se obtenía al cargar las muestras directamente.

Este procedimiento, aunque dio lugar a buenos resultados, el análisis de las muestras resultaba largo y complejo, por ello se continuó la investigación con el objetivo de obtener un MIP más selectivo donde se minimizaran las interacciones inespecíficas de los compuestos de la matriz. De esta forma, las muestras complejas se podrían analizar tras una única etapa de extracción en fase sólida.

El **capítulo 3** describe la síntesis de un polímero impreso semi-covalente como un procedimiento alternativo para conseguir una mayor limpieza de las muestras, ya que

dicho polímero teóricamente proporciona una mayor selectividad. Como se detalla en el apartado III.1.2.1. de la introducción, esto se debe a la unión covalente entre la propazina y el metacrilato de metilo antes de llevar a cabo la polimerización, lo que permite obtener una mejor definición de los puntos de unión específica.

En el caso de emplear un método de polimerización no covalente, todos los autores coinciden en afirmar que el polímero no impreso más representativo de las interacciones no específicas es aquel que se sintetiza en idénticas condiciones que el correspondiente MIP, salvo por la ausencia del analito plantilla durante la síntesis del polímero. Sin embargo, la selección de un polímero no impreso (de control), que sea representativo del tipo de interacciones inespecíficas que tienen lugar en el MIP se complica en el caso de emplear la polimerización covalente. Además, dado que para la eliminación de la plantilla se requieren condiciones considerablemente más agresivas para poder romper el enlace covalente plantilla-polímero (hidrólisis), es necesario evaluar el efecto que dicho proceso tiene sobre el funcionamiento posterior del polímero.

La correcta selección del polímero control es crucial para poder optimizar las etapas del proceso MISPE. Por ello, teniendo en cuenta los posibles tipos de interacciones inespecíficas que pueden tener lugar y basándose en ellos, se han sintetizado diferentes polímeros control. En este sentido, en el **capítulo 3** se describe la preparación de cuatro polímeros control y la correspondiente evaluación de su comportamiento para seleccionar el más representativo y el efecto que la hidrólisis básica puede tener sobre la matriz polimérica.

El analito seleccionado para comparar el comportamiento de los diferentes polímeros control y el del polímero impreso ha sido un herbicida de la familia de las fenilureas, en concreto el isoproturón. Este compuesto tiene un tamaño y polaridad análogas a las de la propazina, por lo que cabe esperar que dé lugar a la formación de unas interacciones inespecíficas similares a las de ésta. De esta forma, los estudios de recuperación de este analito en los distintos polímeros ha permitido seleccionar el



polímero control que mejor representa las interacciones inespecíficas existentes en el polímero impreso.

La comparación de los resultados obtenidos para los diferentes polímeros control y el MIP ha permitido seleccionar el polímero CP-4 como el más representativo. Se ha demostrado que la presencia de grupos de metacrilato presentes en la matriz polimérica es una de las principales fuentes de interacciones inespecíficas con los analitos. La comparación del funcionamiento de los diferentes polímeros control ha permitido comprobar que la matriz polimérica se ve profundamente afectada durante el proceso de hidrólisis necesario para la eliminación de la plantilla.

Una vez seleccionado el polímero no impreso más representativo, se han optimizado las etapas de extracción en fase sólida para lograr la máxima limpieza de las muestras. De un modo análogo al empleado con el polímero no covalente, se ha evaluado el efecto que la disolución de lavado tiene sobre la recuperación de cada una de las triazinas en el MIP y en el polímero no impreso CP-4. La disolución de lavado óptima ha sido una mezcla de acetonitrilo y tolueno (5:95, v/v). Por otra parte, en lo referente a la etapa de elución, cabe destacar que es preciso añadir un 5% de ácido acético a la disolución de elución para conseguir una recuperación cuantitativa de las triazinas retenidas, lo que indica que su interacción con el polímero semi-covalente es más fuerte que con el polímero impreso no covalente.

La obtención de un MIP semi-covalente muy selectivo para triazinas ha permitido eliminar los interferentes de muestras vegetales complejas como maíz, patatas y suelos en una única etapa. Este polímero proporciona una limpieza similar a la obtenida al emplear el método anteriormente descrito basado en una limpieza previa de los extractos en el polímero no impreso, lo que disminuye considerablemente el tiempo de análisis.

En las tablas 22 y 23 se recogen el % de recuperación y el límite de detección obtenido para diferentes triazinas en diversas muestras enriquecidas, por cada uno de los

procedimientos descritos. Es importante destacar que no se ha observado efecto matriz en ninguno de los casos.

**TABLA 22: Recuperaciones (%) de triazinas en muestras vegetales y suelos mediante los distintos procedimientos MISPE-HPLC**

<u><b>GUISANTES</b></u>					
<b>Procedimiento</b>	<b>DIA</b>	<b>DEA</b>	<b>SIM</b>	<b>A</b>	<b>PPZ</b>
MISPE (no cov.)	70 ± 6	75 ± 5	87 ± 6	76 ± 5	78 ± 4
NIP + MISPE (no cov.)	81 ± 2	87 ± 3	86 ± 3	88 ± 3	88 ± 3
<u><b>MAIZ</b></u>					
<b>Procedimiento</b>	<b>DIA</b>	<b>DEA</b>	<b>SIM</b>	<b>A</b>	<b>PPZ</b>
MISPE (no cov.)	n.d.	n.d.	72 ± 6	93 ± 7	n.d.
NIP + MISPE (no cov.)	78 ± 3	95 ± 5	96 ± 5	94 ± 7	97 ± 5
MISPE (semi-cov.)	n.d.	96 ± 4	85 ± 7	92 ± 3	97 ± 2
<u><b>PATATAS</b></u>					
<b>Procedimiento</b>	<b>DIA</b>	<b>DEA</b>	<b>SIM</b>	<b>A</b>	<b>PPZ</b>
MISPE (no cov.)	n.d.	88 ± 4	91 ± 5	93 ± 4	116 ± 6
NIP + MISPE (no cov.)	94 ± 3	97 ± 6	94 ± 5	98 ± 6	96 ± 7
MISPE (semi-cov.)	83 ± 8	86 ± 6	81 ± 3	85 ± 8	89 ± 4
<u><b>SUELOS</b></u>					
<b>Procedimiento</b>	<b>DIA</b>	<b>DEA</b>	<b>SIM</b>	<b>A</b>	<b>PPZ</b>
MISPE (no cov.)	95 ± 8	99 ± 3	92 ± 6	105 ± 3	51 ± 10
MISPE (semi-cov.)	91 ± 4	93 ± 5	89 ± 6	95 ± 4	90 ± 3

**TABLA 23: Límites de detección\* (mg/Kg) para diferentes triazinas obtenidos en muestras vegetales y en suelos**

<b><u>GUISANTES</u></b>					
<b>Procedimiento</b>	<b>DIA</b>	<b>DEA</b>	<b>SIM</b>	<b>A</b>	<b>PPZ</b>
MISPE (no cov.)	0,6	0,5	0,5	0,6	0,5
NIP + MISPE (no cov.)	0,7	0,3	0,5	0,4	0,3
<b><u>MAIZ</u></b>					
<b>Procedimiento</b>	<b>DIA</b>	<b>DEA</b>	<b>SIM</b>	<b>A</b>	<b>PPZ</b>
MISPE (no cov.)	n.d.	n.d.	1,6	2,1	n.d.
NIP + MISPE (no cov.)	0,7	0,9	0,8	0,7	0,7
MISPE (semi-cov.)	n.d.	0,7	0,7	0,8	0,9
<b><u>PATATAS</u></b>					
<b>Procedimiento</b>	<b>DIA</b>	<b>DEA</b>	<b>SIM</b>	<b>A</b>	<b>PPZ</b>
MISPE (no cov.)	n.d.	1,7	1,4	1,6	1,6
NIP + MISPE (no cov.)	0,9	0,8	0,6	0,7	0,7
MISPE (semi-cov.)	1,2	0,9	0,9	1,3	1,3
<b><u>SUELOS</u></b>					
<b>Procedimiento</b>	<b>DIA</b>	<b>DEA</b>	<b>SIM</b>	<b>A</b>	<b>PPZ</b>
MISPE (no cov.)	2,4	2,1	1,9	1,8	1,9
MISPE (semi-cov.)	2,1	1,8	1,6	1,5	1,5

\* Calculados como el triple de la relación S/N

Los resultados obtenidos muestran que la metodología desarrollada, basada en el empleo de polímeros impresos como adsorbentes selectivos en procesos de extracción en fase sólida, permite eliminar la matriz interferente en la cuantificación de las triazinas. En este sentido, la limpieza de muestras vegetales sencillas como los guisantes mediante el polímero impreso permitió cuantificar todas las triazinas evaluadas a niveles de concentración inferiores a los valores máximos legislados.

Por otro lado, en el caso de la limpieza de muestras extraordinariamente complejas como pueden ser el maíz o las patatas, la cuantificación de las triazinas requiere de una limpieza mucho más exhaustiva de las muestras para eliminar la matriz. En este sentido, se han desarrollado dos métodos basados en una limpieza previa de los extractos de las muestras en el polímero no impreso y su posterior tratamiento mediante el MIP no covalente o en una limpieza directa de las muestras sobre el MIP semi-covalente. El tratamiento de las muestras mediante uno u otro método permite la eliminación de las especies interferentes, posibilitando la determinación de las triazinas evaluadas a niveles de concentración inferiores a los valores máximos legislados.

Por último, en los **capítulos 2 y 3** se ha llevado a cabo la caracterización físico-química de ambos polímeros impresos, no covalente y semi-covalente, con el fin de profundizar en el mecanismo de interacción de ambos polímeros con las triazinas. Dicho mecanismo se ha evaluado mediante las isothermas de adsorción, que permiten estudiar el funcionamiento del polímero en un amplio intervalo de concentraciones. De entre todos los modelos disponibles para el ajuste de las isothermas de adsorción, se ha seleccionado el modelo de Langmuir-Freundlich según la ecuación:

$$B = \frac{N_t a F^m}{1 + a F^m}$$

donde **B** representa la cantidad de compuesto enlazada al polímero, **F** la no enlazada, **N<sub>t</sub>** la capacidad, **a** es una medida de la afinidad por las triazinas y el polímero y **m** es el coeficiente de heterogeneidad. La constante de afinidad media K<sub>0</sub> se calcula por medio de la fórmula K<sub>0</sub> = a<sup>1/m</sup>.

La elección de uno u otro modelo para realizar el ajuste de una isoterma experimental depende tanto de la homogeneidad del material como del intervalo de concentraciones estudiado. En general, el modelo de Langmuir-Freundlich es capaz de caracterizar correctamente materiales tanto homogéneos como heterogéneos que presenten una afinidad intermedia, siendo por ello uno de los modelos más adecuados para la caracterización de los polímeros impresos.

En la tabla 24 se resumen los parámetros obtenidos para el ajuste de las isotermas de adsorción de la propazina con ambos polímeros mediante el modelo de Langmuir-Freundlich.

**TABLA 24: Parámetros obtenidos en el ajuste de las isotermas de adsorción de la propazina según el modelo de Lagmuir-Freundlich**

Polímero	$N_t$ ( $\mu\text{mol/g}$ )	$m$	$a$ ( $\text{mM}^{-1}$ )	$K_0$ ( $\text{mM}^{-1}$ )
Semi-covalente	0,380	0,95	117	152
No covalente	0,249	0,80	345	1484

## 2. - POLÍMEROS IMPRESOS CON TIABENDAZOL:

### Determinación de benzimidazoles en muestras de agua

Como se ha visto en el capítulo III.3.2., la baja concentración en que se pueden encontrar los benzimidazoles en las muestras de agua hace que generalmente éstas deban someterse a una etapa de preconcentración más o menos exhaustiva. La elección de un método de preconcentración adecuado para la determinación simultánea de diversos benzimidazoles puede llegar a ser extraordinariamente compleja, debido al amplio espectro de propiedades físico-químicas que pueden presentar estos compuestos los diferentes fungicidas de esta familia.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método de limpieza y preconcentración que permitiese la determinación simultánea de los benzimidazoles más utilizados en muestras de agua, empleando el HPLC en fase inversa como medio de separación y la detección UV-Vis.

En el **capítulo 4** se describe la síntesis de un polímero impreso con tiabendazol y ácido metacrílico como monómero y su aplicación a la determinación de diferentes benzimidazoles en muestras de agua de grifo, pozo y río a un nivel de concentración

inferior al valor máximo legislado (0,1 µg/L). Los benzimidazoles analizados han sido: albendazol, benomil, carbendazim, fenbendazol, flubendazol, fuberidazol y tiabendazol.

Primeramente, se sintetizaron dos polímeros impresos empleando tiabendazol y ácido metacrílico y variando la naturaleza del entrecruzante: etilenglicol dimetacrilato (EDMA) y divinilbenceno (DVB). Tras la eliminación de la plantilla mediante extracción Soxhlet y la optimización de las distintas etapas del proceso MISPE para cada uno de los dos polímeros, se obtuvo un factor de impresión (calculado como  $K_{MIP}/K_{NIP}$ ) en ambos polímeros superior a 40, lo que significaba un alto grado de reconocimiento de los benzimidazoles.

Otro factor a considerar fue el volumen de ruptura, ya que uno de los objetivos del trabajo era la obtención de un adsorbente selectivo que permitiese la preconcentración de la muestra con un elevado factor de preconcentración.

En la tabla 25 se muestra el % de recuperación obtenido para diferentes benzimidazoles en cada uno de los polímeros. Como puede apreciarse, el polímero sintetizado con EDMA presenta unas recuperaciones ligeramente superiores al sintetizado con DVB, pero dado que éste último presentó un volumen de ruptura considerablemente superior (500 mL, en comparación con los 150 mL del polímero de EDMA), se seleccionó como óptimo para la continuación del trabajo.

**TABLA 25: Influencia del entrecruzante empleado en la síntesis del polímero impreso sobre el % de recuperación de los benzimidazoles. (RSD < 6%)\***

Benzimidazol	EDMA-MIP	DVB-MIP
Albendazol	89	78
Benomil	94	79
Carbendazim	97	83
Fenbendazol	91	81
Flubendazol	88	85
Fuberidazol	94	82
Tiabendazol	86	78

\* Monómero: ácido metacrílico, iniciador: AIBN, porogen: AcN/Tol (3:1, v/v)

Lavado: EDMA-MIP: 5 mL de acetonitrilo; DVB-MIP: 5 mL de DMSO:AcN (1:49, v/v); Elución: 12 mL MeOH:HAc (1:1, v/v)

El polímero entrecruzado con DVB se ha aplicado con éxito a la preconcentración de muestras de agua de río, grifo y pozo. Estas muestras se han enriquecido con diferentes benzimidazoles a un nivel de concentración que osciló entre 0,1 y 1 µg/L. Los extractos de las muestras preconcentradas en la etapa MISPE se han evaporado a sequedad y redissueltos en 0,30 mL de agua MilliQ para su posterior análisis mediante HPLC-DAD empleando una columna de C<sub>18</sub>.

Paralelamente, se ha aplicado la misma metodología sustituyendo los polímeros impresos sintetizados por adsorbentes comerciales no selectivos como pueden ser los discos de C<sub>18</sub>. La falta de selectividad del proceso conduce a la coextracción de numerosos compuestos que interfieren en la determinación de los benzimidazoles, no pudiéndose determinar fenbendazol o carbendazim en algunas de las muestras. Además, las diferentes propiedades físico-químicas impiden la elución cuantitativa del benomil y el flubendazol en las condiciones de trabajo seleccionadas. En la tabla 26 se recogen las recuperaciones obtenidas para los distintos benzimidazoles tras la preconcentración en discontinuo de las muestras de agua empleando MISPE-HPLC y C<sub>18</sub>-HPLC.

**TABLA 26: % de recuperación obtenidos para diferentes benzimidazoles en muestras de agua (0,1 µg/L) empleando una etapa de preconcentración en discontinuo**

Benzimidazol	MISPE-HPLC-UV	C <sub>18</sub> -HPLC-UV
Albendazol	78-84	75-91
Benomil	81-85	27-52
Carbendazim	80-87	n.d.
Fenbendazol	76-83	n.d.
Flubendazol	79-85	34-43
Fuberidazol	81-87	67-73
Tiabendazol	80-84	n.d.

Por último, se ha evaluado la posibilidad de emplear el polímero impreso DVB-MIP como fase estacionaria de un proceso cromatográfico que permitiera unificar en una única etapa, limpieza, preconcentración y separación de distintos benzimidazoles presentes en muestras de agua de grifo, pozo y río. Para ello, se rellenó una columna de HPLC (50 x 4,6 mm) con aproximadamente 400 mg del polímero MIP-DVB y se pasó a realizar los experimentos necesarios para optimizar la composición de la fase móvil que posibilitara la elución selectiva de los distintos benzimidazoles.

Partiendo de resultados previos [2] que demostraban que el metanol resultaba ser adecuado como fase móvil, se evaluaron distintas mezclas de metanol:ácido acético, con el objetivo de seleccionar aquella que mejor separara los distintos benzimidazoles de la matriz de las muestras. El empleo de metanol a un caudal de 1 mL/min permitió separar los benzimidazoles de los componentes de la matriz ( $t_R \approx 3$  minutos), si bien el pico correspondiente a los benzimidazoles salía muy retenido ( $t_R \approx 45$  minutos), era ancho y con mucha cola. Por ello, se evaluó la posibilidad de introducir cantidades crecientes de ácido acético que permitieran disminuir el tiempo de retención de los benzimidazoles. La fase móvil óptima para lograr la elución selectiva de los benzimidazoles fue:



Tiempo (min)	Composición fase móvil
0 → 3 minutos	Metanol
3 → 10 minutos	Metanol:Acido acético (80:20, v/v)

La evaluación del volumen de ruptura de la columna cromatográfica empaquetada con el MIP dio como resultado valores comprendidos entre 50 mL para albendazol y 150 mL para carbendazim, por lo que se seleccionó un volumen máximo de la muestra de agua a preconcentrar de 50 mL.

En las condiciones experimentales descritas, todos los benzimidazoles evaluados coeluyen de la columna cromatográfica, es decir, no existe separación entre ellos, si bien se separaron perfectamente de la matriz. La evaluación del porcentaje de recuperación y los límites de detección obtenidos para los diferentes benzimidazoles en las muestras de agua enriquecidas para los procedimientos “off-line” y “on-line” se muestran en las tablas 27 y 28.

**TABLA 27: % Recuperación obtenida para distintos benzimidazoles en muestras de agua enriquecidas con 0,1 µg/L. RSD ≤ 5% (n = 5)**

<b><u>AGUA DE GRIFO</u></b>							
<b>Procedimiento</b>	<b>ABZ</b>	<b>BEN</b>	<b>MBC</b>	<b>FenBZ</b>	<b>FluBZ</b>	<b>FuBZ</b>	<b>TBZ</b>
MISPE-HPLC (discontinuo)	83	78	78	86	83	80	79
MIP-LC (continuo)	99	102	100	106	104	99	100
<b><u>AGUA DE POZO</u></b>							
<b>Procedimiento</b>	<b>ABZ</b>	<b>BEN</b>	<b>MBC</b>	<b>FenBZ</b>	<b>FluBZ</b>	<b>FuBZ</b>	<b>TBZ</b>
MISPE-HPLC (discontinuo)	86	77	78	85	82	73	76
MIP-LC (continuo)	104	102	100	105	103	89	96
<b><u>AGUA DE RIO</u></b>							
<b>Procedimiento</b>	<b>ABZ</b>	<b>BEN</b>	<b>MBC</b>	<b>FenBZ</b>	<b>FluBZ</b>	<b>FuBZ</b>	<b>TBZ</b>
MISPE-HPLC (discontinuo)	85	79	81	83	79	77	81
MIP-LC (continuo)	102	103	104	103	99	95	102

**TABLA 28: Límites de detección\* (µg/L) obtenidos para la cuantificación de benzimidazoles en muestras de agua**

<b><u>AGUA DE GRIFO</u></b>							
<b>Procedimiento</b>	<b>ABZ</b>	<b>BEN</b>	<b>MBC</b>	<b>FenBZ</b>	<b>FluBZ</b>	<b>FuBZ</b>	<b>TBZ</b>
MISPE-HPLC (discontinuo)	0,012	0,006	0,008	0,007	0,003	0,008	0,009
MIP-LC (continuo)	0,08	0,04	0,07	0,06	0,03	0,06	0,07
<b><u>AGUA DE POZO</u></b>							
<b>Procedimiento</b>	<b>ABZ</b>	<b>BEN</b>	<b>MBC</b>	<b>FenBZ</b>	<b>FluBZ</b>	<b>FuBZ</b>	<b>TBZ</b>
MISPE-HPLC (discontinuo)	0,011	0,007	0,005	0,006	0,003	0,002	0,005
MIP-LC (continuo)	0,09	0,05	0,04	0,04	0,04	0,03	0,04
<b><u>AGUA DE RIO</u></b>							
<b>Procedimiento</b>	<b>ABZ</b>	<b>BEN</b>	<b>MBC</b>	<b>FenBZ</b>	<b>FluBZ</b>	<b>FuBZ</b>	<b>TBZ</b>
MISPE-HPLC (discontinuo)	0,010	0,006	0,006	0,005	0,004	0,004	0,006
MIP-LC (continuo)	0,09	0,05	0,04	0,04	0,04	0,03	0,05

\* Calculados como el triple de la relación S/N

Se observa unas excelentes recuperaciones en todos los casos, con límites de detección, evaluados como el triple de la relación S/N, inferiores a los MRLs. Es importante destacar que no se ha observado efecto matriz en ninguno de los casos.

Por todo lo expuesto, este método de preconcentración en continuo de las muestras de agua se propone como método excelente de “screening” para detectar la presencia de benzimidazoles en agua, debido tanto a su rapidez como a su posibilidad de automatización. Las muestras de agua se preconcentran inicialmente mediante el método en continuo, y sólo en el caso de que se detecte la presencia de benzimidazoles en una muestra determinada, éstos pueden cuantificarse mediante el método descrito para la preconcentración en discontinuo.

### *Determinación de tiabendazol en muestras de cítricos*

El objetivo de este trabajo fue llevar a cabo la separación de diferentes benzimidazoles por electrocromatografía capilar empleando una columna capilar rellena de un polímero impreso para estos compuestos. Para ello, fue necesario aprender toda la metodología necesaria para la preparación y caracterización de polímeros impresos en formato monolito “*in situ*”, es decir, en el interior de columnas capilares. El aprendizaje se realizó durante una estancia de tres meses en la empresa AstraZeneca (Mölndal, Suecia). En esta estancia se optimizaron las condiciones experimentales para la síntesis de diferentes monolitos impresos para la separación electrocromatográfica de racémicos de *Boc*-fenilalanina (*Boc*-Phe) y propranolol. Tan sólo se obtuvieron resultados satisfactorios en el caso del propranolol pues, si bien se llevó a cabo una optimización exhaustiva de todas las variables experimentales que afectan al proceso MIP-CEC, los monolitos sintetizados en presencia de *Boc*-Phe no mostraron impresión en ninguno de los casos. Los resultados más relevantes obtenidos de este estudio se resumen en el **capítulo 5** (apartado IV.5.1.).

Esta metodología se ha aplicado a la preparación de polímeros impresos con tiabendazol. Para lograr la retención selectiva de los distintos benzimidazoles, ha sido necesario optimizar tanto las condiciones empleadas para la síntesis de los monolitos como las condiciones electroforéticas.

En el **capítulo 4** se describe la preparación de dos polímeros impresos con tiabendazol, empleando EDMA o DVB como entrecruzantes. De ellos, el polímero sintetizado en presencia de EDMA presenta menos interacciones inespecíficas. Atendiendo a estos resultados, se seleccionó este polímero para su empleo como fase estacionaria en electrocromatografía capilar, pero hubo que modificar el procedimiento de síntesis para adaptarlo a la obtención de un monolito lo suficientemente poroso como para permitir bombear a su través el electrolito empleado como fase móvil en el proceso electroforético.

En la bibliografía se han descrito dos procedimientos que permiten controlar rigurosamente la porosidad de los monolitos obtenidos. Uno de ellos consiste en un estricto ajuste del tiempo de síntesis del polímero y el otro en la introducción de un pequeño volumen de isooctano como modificador del porogen. Para la realización de este estudio se controlaron tanto el tiempo de polimerización como la cantidad de isooctano añadida, obteniéndose un resultado óptimo para los polímeros preparados en presencia de un 4% de isooctano, siempre que el tiempo de polimerización se mantuviese por debajo de 2 horas.

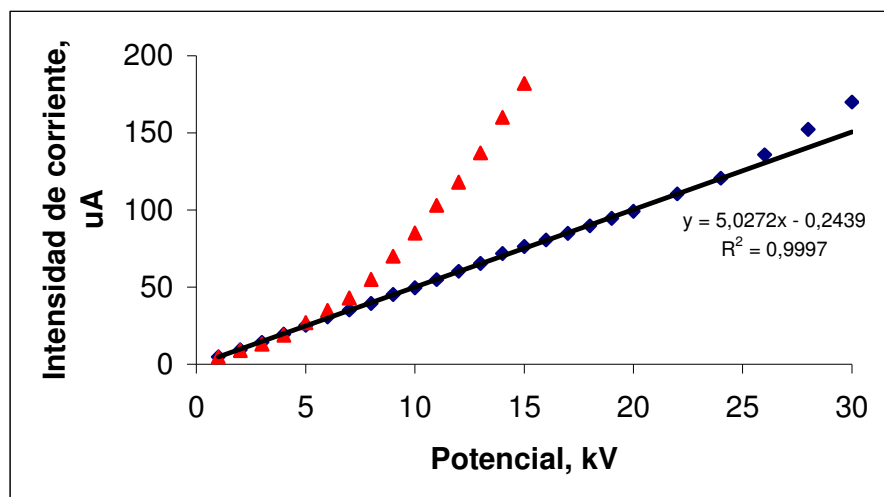
Una vez preparado el monolito inicial, se optimizaron las condiciones electrocromatográficas para lograr una retención selectiva de los diferentes benzimidazoles en el polímero impreso. En este sentido, se evaluaron diversos disolventes como fase móvil en el proceso electrocromatográfico. Los resultados mostraron que el monolito era capaz de reconocer selectivamente los benzimidazoles en presencia de cloroformo, acetona y acetonitrilo, siendo la reproducibilidad de los tiempos de retención considerablemente superior en este último caso. Por otro lado, el monolito impreso presentaba un comportamiento análogo al del polímero no impreso cuando se empleaba metanol como fase móvil del proceso CEC.

El empleo de acetonitrilo como fase móvil conducía a la obtención de picos con una cola considerable, por lo que se evaluó la posibilidad de añadir pequeñas cantidades de ácido a la disolución con el objetivo de favorecer la desorción de los benzimidazoles y disminuir de esta forma la cola de los picos. En este sentido, se varió tanto la naturaleza del ácido empleado como su concentración. Este estudio ha demostrado que el contenido de ácido es especialmente crítico pues, si bien un incremento de su concentración conduce a una mayor resolución de los picos al disminuir drásticamente la cola de los mismos, el factor de impresión disminuye considerablemente hasta hacerse prácticamente despreciable para contenidos de ácido cítrico superiores al 10%. Por lo tanto, se han seleccionado como condiciones óptimas el empleo de una fase móvil de acetonitrilo con un 4% (p/v) de ácido cítrico.

Por último, se ha evaluado el efecto del potencial y de la temperatura de la separación sobre la eficacia del proceso de separación y el factor de impresión. Los mejores resultados se obtuvieron para condiciones que favorecían el tiempo de contacto de los benzimidazoles con el polímero, tales como un potencial lo más bajo posible y una temperatura alta. Si bien el factor de impresión máximo se obtuvo cuando se aplicaba un potencial de separación de 1 kV, el tiempo de análisis en este caso era considerablemente más largo que si se incrementaba dicho potencial a 2 kV.

Es importante destacar que el control de la temperatura en electrocromatografía capilar es especialmente crítico, ya que la utilización de capilares rellenos no permite una buena transmisión de calor, por lo que la termostatización del capilar no es la adecuada. Un calentamiento por efecto Joule, tanto más acusado al aumentar el potencial, produce una variación de la temperatura que da lugar a una alta irreproducibilidad en los tiempos de retención. Este efecto es tanto más acusado cuanto menor sea la temperatura.

Este fenómeno se ha comprobado midiendo la intensidad de corriente obtenida al variar el potencial. Siempre que la resistencia sea constante, debe existir una relación lineal entre ambos parámetros (ley de Ohm). Si la temperatura no se mantiene constante, la resistencia variará y la relación entre el potencial aplicado y la intensidad de corriente generada no será lineal. El estudio se realizó variando la temperatura entre 20 y 60°C, y se representó la intensidad en función del potencial para cada temperatura. En la figura 27 se muestran los resultados para 20 y 60°C, observándose como a 20°C la variación de la temperatura por efecto Joule no permite la termostatización del capilar, lo que origina una gran irreproducibilidad (RSD 30-40%) en los tiempos de retención. A 60°C, este hecho sólo tiene lugar a potenciales muy altos (> 25 kV).



**FIGURA 27:** Variación de la intensidad de corriente con el potencial a una temperatura de 20°C (▲) y 60°C (◆)

Una vez optimizadas las condiciones electrocromatográficas para lograr la retención selectiva de los benzimidazoles en el monolito impreso, se han optimizado las diferentes variables que afectan a la síntesis del mismo, con el objeto de conseguir un polímero impreso que presente la mayor afinidad posible por los diferentes benzimidazoles. En este sentido, se han optimizado la concentración de monómero (MAA), entrecruzante (EDMA), plantilla (tiabendazol) e iniciador (AIBN), para lo cual se ha planteado un diseño factorial fraccionado de tres niveles para cada uno de estos compuestos.

En la tabla 29 se recogen las diferentes mezclas de estos cuatro compuestos empleadas en la síntesis de los diferentes monolitos.

**TABLA 29: Mezclas empleadas en la preparación de los distintos monolitos impresos**

Monolito	MAA, $\mu\text{M}$	EDMA, $\mu\text{M}$	TBZ, $\mu\text{M}$	AIBN, $\mu\text{M}$
1	30	150	7,5	3
2	30	150	15,0	6
3	30	150	22,5	9
4	30	300	15,0	3
5	30	300	22,5	6
6	30	300	7,5	9
7	30	450	22,5	3
8	30	450	7,5	6
9	30	450	15,0	9
10	60	150	15,0	3
11	60	150	22,5	6
12	60	150	7,5	9
13	60	300	22,5	3
14	60	300	7,5	6
15	60	300	15,0	9
16	60	450	7,5	3
17	60	450	15,0	6
18	60	450	22,5	9
19	90	150	22,5	3
20	90	150	7,5	6
21	90	150	15,0	9
22	90	300	7,5	3
23	90	300	15,0	6
24	90	300	22,5	9
25	90	450	15,0	3
26	90	450	22,5	6
27	90	450	7,5	9
28	60	300	15,0	6

Tras la eliminación del tiabendazol empleado como plantilla mediante bombeo de una disolución de metanol:ácido acético (50:50, v/v) a un caudal de 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  en los diferentes monolitos, se ha evaluado la selectividad del reconocimiento del tiabendazol bajo las condiciones electrocromatográficas optimizadas anteriormente. Los resultados obtenidos para el factor de impresión y la eficacia para cada uno de los polímeros se han ajustado en función de la concentración de cada uno de los compuestos empleados en la polimerización mediante la técnica de mínimos cuadrados parciales. De esta forma ha sido posible no sólo seleccionar las condiciones óptimas para llevar a cabo la síntesis del monolito, sino que también se ha podido establecer un modelo para evaluar la influencia de cada uno de estos parámetros sobre el reconocimiento de los benzimidazoles en los polímeros impresos.

En este sentido, se ha observado cómo los parámetros que más afectan al reconocimiento son las concentraciones de iniciador y plantilla empleados en la síntesis de los polímeros. En la superficie de respuesta obtenida para la variación de ambos parámetros se observa un máximo para una concentración de iniciador de 6  $\mu\text{M}$  y de plantilla de 15  $\mu\text{M}$ .

En la tabla 30 se resumen las condiciones óptimas para lograr la retención selectiva de los benzimidazoles en un monolito impreso preparado empleando tiabendazol como analito plantilla.



**TABLA 30: Condiciones óptimas para la retención selectiva de tiabendazol mediante MIP-CEC**

<b>Síntesis de los monolitos</b>	<i>Analito plantilla</i>	Tiabendazol, 15 $\mu$ M
	<i>Monómero</i>	Acido metacrílico, 60 $\mu$ M
	<i>Entrecruzante</i>	Etilenglicol dimetacrilato, 300 $\mu$ M
	<i>Iniciador</i>	Azo-bisisobutironitrilo, 6 $\mu$ M
	<i>Porogen</i>	Tolueno:isooctano (96:4, v/v)
	<i>Tiempo</i>	90 minutos
<b>Condiciones electrocromatográficas</b>	<i>Fase móvil</i>	Acetonitrilo
	<i>Electrolito</i>	Acido cítrico, 4% p/v
	<i>pH<sub>app</sub></i>	4,6
	<i>Potencial</i>	-2 kV
	<i>Temperatura</i>	60°C

Bajo estas condiciones, el polímero es capaz de interaccionar selectivamente tanto con el tiabendazol como con otros benzimidazoles ampliamente utilizados en la protección de cultivos de cítricos (benomil) o formados como producto de su degradación (carbendazim). No obstante, aún a pesar de que el monolito impreso no permita llevar a cabo la separación de estos compuestos entre sí, la presencia de tiabendazol junto con cualquiera de estos benzimidazoles en las muestras de cítricos es altamente improbable.

La identificación de los distintos benzimidazoles presentes en la muestra se ha realizado comparando sus espectros de absorción UV-Vis en las condiciones de trabajo. En general, dichos espectros presentan máximos de absorción a 240, 280 y 305 nm por lo que se han seleccionado estas longitudes de onda para el estudio. Se ha evaluado la contribución de la absorbancia de cada uno de los benzimidazoles a la absorbancia total del sistema en una mezcla de los mismos. En la tabla 31 se resumen los resultados de este estudio.

**TABLA 31: % de contribución de cada uno de los benzimidazoles a la absorbancia total del sistema (mezcla de 1 mg/L) a diferentes longitudes de onda.**

Benzimidazol	240 nm	280 nm	305 nm
Benomil	45	69	1
Carbendazim	52	26	< 1
Tiabendazol	3	5	98

Estos resultados demuestran que la longitud de onda óptima para la determinación de tiabendazol es de 305 nm, donde apenas presenta interferencias de benomil o carbendazim. En el caso de la cuantificación de benomil y carbendazim, lo más conveniente sería plantear un calibrado multivariante y monitorizar la señal obtenida tanto a 240 como a 280 nm o bien emplear un método de detección alternativo como la espectrometría de masas que permita la identificación inequívoca de los mismos.

El método desarrollado se ha aplicado con éxito a la cuantificación del contenido de tiabendazol en muestras enriquecidas de piel y pulpa de naranja y limón a niveles de concentración inferiores a los valores máximos legislados (5 mg/kg). En la tabla 32 se muestran las recuperaciones obtenidas y los valores de los límites de detección para la cuantificación de tiabendazol en las diferentes muestras.

**TABLA 32: Recuperaciones obtenidas (%) a dos niveles de concentración y límites de detección\* (mg/kg) para la determinación de tiabendazol mediante MIP-CEC.**

$RSD \leq 7\%$  ( $n=5$ )

<u>LIMON</u>			
Muestra	% Recuperación		LD
	1 mg/kg	5 mg/kg	
Piel	95	89	0,04
Pulpa	97	91	0,04
<u>NARANJA</u>			
Muestra	% Recuperación		LD
	1 mg/kg	5 mg/kg	
Piel	103	85	0,05
Pulpa	105	93	0,04

\* Calculados como el triple de la relación S/N

**Bibliografía:**

- [1] E. Turiel, A. Martín-Esteban, P. Fernández, C. Pérez-Conde, C. Cámara, *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 5133
- [2] E. Turiel, J.L. Tadeo, P.A.G. Cormack, A. Martín-Esteban, *Analyst*, **2005**, 130, 1601

*VI. CONCLUDING  
REMARKS*



## VI. CONCLUDING REMARKS

*The most remarkable conclusions that can be inferred from the presented work are:*

- Different clean-up and enrichment methodologies for the determination of pesticides in complex samples have been developed based on molecularly imprinting technology. In this sense, molecularly imprinted polymers have been used both as selective sorbents in on-line or off-line solid-phase extraction procedures or as selective stationary phases in capillary electrochromatography.*
- A non-covalent imprinted polymer has been synthesized by precipitation polymerisation using propazine as template molecule. This polymer has been used as selective sorbent in a MISPE procedure for the quantification of triazine herbicides and their degradation products in vegetable samples. This procedure, based in the clean-up of the sample extracts on the non-covalent MIP, has been successfully applied to the determination of triazine compounds in pea samples at concentration levels below the legislated MRLs.*
- An alternative method has been developed for the analysis of triazine compounds in very complex samples. In this sense, a two-step MISPE procedure based on the clean-up of sample extracts in a non-imprinted polymer prior to their clean-up by a non-covalent imprinted polymer has been developed. The developed methodology*

*enabled the analysis of triazine compounds in very complex samples (i.e. corn or potatoes) at concentration levels below the legislated MRLs.*

- *A semi-covalent imprinted polymer has been synthesized by precipitation polymerisation using propazine methacrylate as template molecule. This polymer has been successfully applied as selective sorbent in a MISPE procedure to the clean-up of very complex samples (corn, potatoes and soils) with a unique washing step. The developed methodology enabled the analysis of triazine compounds at concentration levels below the legislated MRLs.*
  
- *Two molecularly imprinted polymers have been synthesized using thiabendazole as template molecule, methacrylic acid as functional monomer and ethyleneglycol dimethacrylate or divinylbenzene as cross-linkers. These imprinted polymers have been tested for the selectivity of the rebinding of several benzimidazole compounds and the breakthrough volume. Although both imprinted polymers were able of selectively rebinding benzimidazole compounds in aqueous media, divinylbenzene-imprinted polymer presented a much higher breakthrough volume, and thus was selected for the selective enrichment of benzimidazole compounds present in water samples.*

- *An on-line MISPE-LC methodology has been developed for the screening analysis of benzimidazole fungicides in tap, river and well water samples. Positive samples were subsequently analyzed by an off-line MISPE-HPLC enrichment procedure, in order to quantify the amount of the different benzimidazole compounds present in the samples.*
  
- *Different imprinted monoliths have been evaluated for the selective enantioseparation of propranolol racemates by capillary electrochromatography. The best imprinted monolith yielding a higher enantiospecificity was that prepared by UV-initiated polymerization for 1 hour in the presence of 0.015 mM s-propranolol, 0.730 mM methacrylic acid, 0.650 mM trimethylolpropyl trimethacrylate, 0.044 mM azo-bis-isobutyronitrile and a porogenic mixture containing 6% of iso-octane in toluene.*
  
- *A set of imprinted monoliths have been evaluated for the selective recognition of thiabendazole present in citrus samples by capillary electrochromatography. The best imprinted polymer was synthesized by UV-initiated polymerization for 90 minutes using 0.015 mM thiabendazole, 0.060 mM methacrylic acid, 0.300 mM ethyleneglycol dimethacrylate, 0.006 mM azo-bis-isobutyronitrile and a porogenic mixture containing 4% of iso-octane in toluene. The optimum imprinted monolith proved to be extremely selective, enabling direct separation of thiabendazole from matrix compounds inside the MIP-capillary columns, thus enabling its quantification in*



*crude citrus sample extracts at concentration levels below the legislated MRLs.*

- *All the developed analytical methodologies have been conveniently validated by comparison of the results with those coming from other reference methods of analysis or recovery studies.*
  
- *The synthesized imprinted polymers have been characterised by means of Langmuir-Freundlich adsorption isotherms, thus quantifying their capacity, homogeneity and affinity towards the different analytes.*